



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/54, 15/82, A01H 5/00, A01N 63/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/56897 (43) Date de publication internationale: 28 septembre 2000 (28.09.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00714 (22) Date de dépôt international: 22 mars 2000 (22.03.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/03700 22 mars 1999 (22.03.99) FR 99/07646 11 juin 1999 (11.06.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHOBIO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte postale 9163, F-69263 Cedex 09 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FRITIG, Bernard [FR/FR]; 6, rue du Hohwald, F-67460 Souffelweyersheim (FR). TOQUIN, Valérie [FR/FR]; 1, rue Henri Barbusse, Saint Martin des Champs, F-29600 Morlaix (FR). GE-OFFROY, Pierrette [FR/FR]; 10, rue Fischart, F-67000 Strasbourg (FR). LEGRAND, Michel [FR/FR]; 3, rue des Roses, F-67370 Pfettisheim (FR). KAUFFMANN, Serge [FR/FR]; 3, cour du Moulin Zorn, F-67000 Strasbourg (FR). (74) Mandataire: AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.; Département Propriété Industrielle, 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: INDUCIBLE COMTII PROMOTER, CHIMERA GENE CONTAINING SAME AND TRANSFORMED PLANTS (54) Titre: PROMOTEUR INDUCTIBLE COMTII, GENE CHIMERE LE COMPRENANT ET PLANTES TRANSFORMEES (57) Abstract <p>The invention concerns a novel regulating COMTII promoter sequence inducible in response to a mechanical or chemical injury, or in response to aggression by a pathogenic agent, in particular bacterial, fungal or viral, or by an insect or a threadworm. The invention also concerns a chimera gene (or expression cassette) comprising the inventive regulating promoter sequence controlling the expression of a heterologous coding sequence and host organism comprising said chimera gene, the transformed plants containing it and the seeds of said transformed plants.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne une nouvelle séquence de régulation promotrice COMTII inductible en réponse à une blessure, mécanique ou chimique, ou en réponse à une agression par un agent pathogène, notamment bactérien, fongique ou viral, ou par un insecte ou un nématode. Elle concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant la séquence de régulation promotrice selon l'invention qui contrôle l'expression d'une séquence codante hétérologue et un organisme hôte comprenant ledit gène chimère, les plantes transformées le comprenant et les semences (graines) desdites plantes transformées.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

La présente invention concerne une nouvelle séquence de régulation promotrice inductible en réponse à une blessure, mécanique ou chimique, ou en réponse à une
5 agression par un agent pathogène, notamment bactérien, fongique ou viral, ou par un insecte ou un nématode.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant la séquence de régulation promotrice selon l'invention qui contrôle l'expression d'une séquence codante hétérologue, hétérologue signifiant ici une
10 séquence codante différente de la séquence codante native.

La présente invention concerne également un organisme hôte comprenant ledit gène chimère, les plantes transformées le comprenant et les semences (graines) desdites plantes transformées.

Il est connu de l'état de la technique que certains gènes, silencieux en l'absence
15 d'agression, ne sont activés que par une agression tant mécanique que chimique et/ou en réponse à une agression par un agent pathogène, un insecte ou un nématode. De tels gènes et leurs facteurs d'activation sont notamment décrits dans le brevet US 5 670 349.

Ces différents modes de défense sont généralement liés à une régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de défense des plantes par
20 induction de leurs séquences de régulation promotrices. On connaît plusieurs séquences de régulation inductibles comme les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB, tous ces promoteurs étant rappelés avec les références des publications
25 correspondantes par le Tableau 3 du brevet US 5 670 349. On connaît également le promoteur HMG2 décrit dans ce même brevet US 5 670 349, comme le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'amino cyclopropane carboxylate syntase (ACC synthase) de pomme décrits dans la demande de brevet WO 98/45445.

30 La présente invention concerne un nouveau fragment d'acide nucléique, en particulier isolé, comprenant un promoteur de plante (ou séquence de régulation promotrice) inductible, ledit promoteur inductible étant constitué par le promoteur d'un

gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (ci-après COMT II) de plante.

Les gènes d'*O*-méthyltransférase de classe II, dont le gène d'acide caféique-*O*-méthyltransférase de classe II, de plantes sont silencieux (inactifs) en l'absence de toute agression puisque les plantes non agressées ne l'expriment pas, ou pour le moins à des
5 niveaux indétectables par les méthodes d'analyse usuelles. Ainsi, le messenger de la COMT II est indétectable par la technique de " Northern blot " dans différents tissus d'une plante saine non traitée, comme par exemple le tabac (Pellegrini & al., 1993). Cette COMTII et son promoteur sont activés (ou induits) par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, ou aux agressions chimiques par différents
10 produits comme le benzothiazole (BTH), le méthyle jasmonate ou des éliciteurs d'origine végétale comme la pectine.

De manière avantageuse, le fragment d'acide nucléique isolé selon l'invention est constitué par un promoteur de COMTII de plante.

Par COMTII de plante, on entend selon l'invention toute OMT de plante qui n'est
15 pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui l'est à la suite d'une agression mécanique, chimique, par un pathogène, un insecte ou un nématode.

Par plante d'origine de la COMTII, on entend selon l'invention tout organisme pluricellulaire différencié capable de photosynthèse, qu'elle soit monocotylédone ou dicotylédone, comme par exemple le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le
20 colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la COMT II est une COMT de plante dicotylédone, de préférence de tabac.

Par promoteur, on entend selon l'invention la région non codante d'un gène impliqué dans la liaison avec l'ARN polymérase et d'autres facteurs qui sont
25 responsables de l'initiation et de la modulation de la transcription conduisant à la production d'un transcrit d'ARN. Il s'agit plus particulièrement de toute séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon " start " (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.

Le promoteur selon l'invention comprend avantageusement une séquence de plus
30 de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMT II, de préférence de plus de 700, de plus de 800 voire de plus de 900 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, encore plus

préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG. Les promoteurs comprenant plus de 1500 nucléotides en amont de l'ATG de la COMTII font également partie de la présente invention.

Le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription. Le site d'initiation
5 de la transcription est généralement situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

De manière avantageuse, l'extrémité 3' du promoteur COMTII selon l'invention est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG. De préférence, l'extrémité 3' du promoteur COMTII est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site
10 d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

Le promoteur COMTII selon l'invention comprend également au moins une boîte TATA et au moins une boîte CAT. La boîte TATA est généralement située à moins de 50 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, à environ 40 nucléotides
15 en amont. La boîte CAT est généralement située à moins de 100 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, de préférence à environ 100 nucléotides et/ou 80 nucléotides en amont. De manière avantageuse, le promoteur comprend deux boîtes CAT.

Le promoteur selon l'invention comprend également des éléments régulateurs
20 impliqués dans l'expression de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes et des gènes associés à la défense, en particulier au moins une boîte A et/ou au moins une boîte L et/ou au moins une boîte L inversée et/ou au moins une boîte P et/ou au moins une boîte W inversée. La boîte A comprend la séquence suivante CCGTCC. Elle est généralement située à moins de 410 nucléotides du site d'initiation de la transcription.
25 La boîte L comprend la séquence suivante CTTCAACAACCAACC. Elle est généralement située à moins de 180 nucléotides du site d'initiation de la transcription. La première boîte L inversée comprend la séquence suivante GTTAGGTGAAG. Elle est généralement située à moins de 1000 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes L
30 inversées, l'une à environ 970 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et l'autre à environ 440 nucléotides en amont. La deuxième boîte L inversée comprend la séquence suivante TGTTAGGTGTGTGTTT. La boîte P

comprend la séquence suivante CACACCAACTCCCA. Elle est généralement située à moins de 750 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte W inversée comprend la séquence suivante GGTCAG. Elle est généralement située à moins de 1200 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription.

- 5 Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes W inversées, l'une à environ 1110 nucléotides en amont et l'autre à environ 210 nucléotides en amont.

- Le promoteur selon l'invention comprend également au moins une boîte E et/ou au moins une boîte G et/ou au moins une boîte GT. La boîte E comprend la séquence
10 suivante TTCCATCAAG. Elle est généralement située à moins de 110 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte G comprend la séquence suivante CCACGT. Elle est généralement située à moins de 600 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte GT comprend la séquence suivante GGTTAA. Elle est généralement située à moins de 450 nucléotides en amont du site d'initiation de
15 la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes GT, l'une à environ 400 nucléotides en amont et l'autre à environ 280 nucléotides en amont.

- Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le promoteur selon l'invention est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la séquence
20 nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1). De préférence le promoteur COMTII de tabac comprend la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1795 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues. Préférentiellement le promoteur COMTII de tabac comprend la séquence comprise entre
25 les nucléotides 557 et 889 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues. Le promoteur inductible COMTII de tabac est activé par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, ou aux agressions chimiques par différents produits comme le benzothiazole (BTH), le méthyle jasmonate ou des éliciteurs d'origine végétale
30 comme la pectine. L'étude fonctionnelle du promoteur a permis d'identifier les régions impliquées dans l'induction du promoteur dans différentes conditions. Le fragment comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 698 à 1365 est nécessaire et

suffisant pour conférer la sensibilité et l'induction par blessure, par le VMT, la mégaspermine, la pectine et la chitine. Préférentiellement le promoteur COMTII de tabac comprend donc la séquence comprise entre les nucléotides 698 et 1365 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites

5 séquences et leurs séquences homologues. Ce fragment peut être associé à un autre promoteur pour induire l'expression d'un gène par blessure, par le VMT, la mégaspermine, la pectine ou la chitine. Ce fragment peut ainsi être associé au promoteur minimum du RNA 35S du CaMV. La présente invention a donc également pour objet un promoteur chimère comprenant la séquence comprise entre les nucléotides

10 698 et 1365 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues. L'analyse de la réponse du promoteur vis à vis du méthyl jasmonate et les UV indique que le fragment comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 815 et 1795 de la SEQ ID NO 1 est fonctionnel. Dans un mode de réalisation avantageux, le promoteur COMTII de

15 tabac comprend donc la séquence comprise entre les nucléotides 815 et 1795 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues.

Par « séquence capable de s'hybrider de manière sélective », on entend selon l'invention les séquences qui s'hybrident avec les séquences ci-dessus à un niveau

20 supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres séquences d'ADN présentes, notamment d'autres ADNc présentes dans une banque d'ADNc. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences définies par les séquences ID ci-dessus selon l'invention est généralement 10 fois, de préférence 100 fois

25 plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la sonde avec des éléments radioactifs, comme le ^{32}P . L'hybridation sélective est généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ 50°C-60°C). L'hybridation peut bien entendu être

30 effectuée selon les méthodes usuelles de l'état de la technique (notamment Sambrook & al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual).

Par séquence homologue, on entend selon l'invention toute séquence comprenant

plus de 70 % d'homologie, préférentiellement plus de 80 % d'homologie, encore plus préférentiellement plus de 90 % d'homologie, et qui conserve les éléments fonctionnels du COMTII lui conférant ses propriétés de promoteur inductible. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul & al., 1993, J. Mol. Evol. 36 :290-300 ; Altschul & al., 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-10).

L'isolement, le clonage et la caractérisation des promoteurs COMT II à partir des gènes de COMT II se fait selon les méthodes expérimentales usuelles de l'homme du métier pour isoler, cloner et caractériser un promoteur, abondamment décrites dans la littérature.

L'isolement et le clonage d'un gène COMT II se fait par analyse d'une banque génomique préparée à partir de l'ADN de la plante d'intérêt. L'ADN génomique est coupée par une ou plusieurs enzymes de restriction appropriées et introduit dans un vecteur adéquat pour constituer, par des méthodes connues de l'homme du métier, une banque contenant l'ensemble du DNA génomique de la plante (Ausubel et al., 1998; Sambrook et al., 1989).

Le ou les clones renfermant un gène COMT II est (sont) isolé(s) grâce à une sonde nucléotidique. La séquence de la sonde est soit déduite de la séquence protéique si l'enzyme a été purifiée (en suivant son activité, par exemple), soit préparée à partir d'un clone de cDNA issu d'une banque. Cette banque de cDNA est préparée à partir de mRNA extrait de tissus traités de façon à induire l'expression du gène COMT II (par la blessure, l'infection ou un traitement chimique comme décrit dans les exemples ou les figures 1-5). La banque de cDNA est ensuite criblée par des anticorps dirigés contre une protéine COMT II (de tabac par exemple) ou par une sonde nucléotidique déduite de la protéine COMT II de la plante considérée ou déduite des séquences conservées chez les COMT de plantes. Le cDNA ainsi isolé est caractérisé par sa séquence nucléotidique ou par l'activité enzymatique de la protéine recombinante obtenue après expression du cDNA dans un organisme procaryote ou eucaryote.

Les séquences non codantes du cDNA (3' et/ou 5') sont utilisées pour sélectionner, par PCR, en conditions très sélectives, le ou les clones génomiques renfermant le gène COMT II exprimé lors du traitement utilisé pour construire la banque cDNA. Les

séquences promotrices sont alors être isolées par PCR ou toute autre méthode appropriée bien connue de l'homme du métier.

Sur la base des informations contenues dans la présente demande de brevet pour le promoteur COMTII de tabac, l'homme du métier sera à même d'identifier d'autres
5 promoteurs COMTII d'autres espèces végétales une fois le gène COMTII identifié et cloné selon les méthodes usuelles, notamment celles décrites ci-dessus.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une
10 séquence de régulation en 3', la séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur COMT II selon l'invention défini auparavant.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave,
15 le tabac, le coton, etc.

Comme séquence de régulation en 5', on peut utiliser le promoteur COMTII selon l'invention seul ou associé à au moins une partie d'un promoteur d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits lumière dépendants
25 comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose- biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la mosaïque du choux fleur
30 (CAMV 19S ou 35S), ou le promoteur du circovirus (AU 689 311).

On peut encore utiliser le promoteur COMTII selon l'invention en association avec au moins une partie d'un promoteur spécifique de régions ou de tissus particuliers

des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines ([22] Datla, R.& al., *Biotechnology Ann. Rev.* (1997) 3, 269-296), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460) ou de l'oélosine (WO 98/45461).

5 Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec le promoteur COMTII selon l'invention, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus eth du tabac (VET)
10 décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

15 La séquence codante du gène chimère selon l'invention comprend une séquence codante pour un gène rapporteur, comme la séquence codante GUS, ou une séquence codante pour une protéine d'intérêt. Au regard du mode d'induction du promoteur selon l'invention, blessure, infection virale ou réponse à des éliciteurs, la protéine d'intérêt est avantageusement une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux
20 maladies ou aux insectes.

Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les
25 peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants :
l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la
30 drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines

(Kamoun & al., 1993 ; Panabières & al., 1995). De manière préférentielle, le peptide éliciteur fongique est la mégaspermine. La mégaspermine et sa séquence codante est représentée par l'identificateur de séquence n° 13 (SEQ ID 13). De manière plus préférentielle, le gène chimère selon l'invention comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur COMT II et une séquence codante pour la mégaspermine comprend la séquence d'ADN représentée par l'identificateur de séquence n° 14 (SEQ ID 14).

Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photobacterium* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante pour un éliciteur et une séquence de régulation en 3', la séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur inductible.

De manière préférentielle, l'éliciteur est une élicitine, plus préférentiellement la mégaspermine telle que définie ci-dessus.

Le promoteur inductible est avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349, Tableau 3), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'acétyl-coA carboxylate synthase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de réplication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui

peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

5 Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, le gène chimère selon l'invention peut être employé en association avec un gène marqueur de sélection, soit dans un même vecteur, les deux gènes étant associés de manière convergente, divergente ou colinéaire, ou encore dans deux vecteurs employés simultanément pour la transformation de l'organisme hôte. De tels gènes marqueurs et leur utilisation pour la
10 transformation des plantes sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles), des gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement
15 identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

20 L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des cellules végétales par intégration au génome des dites cellules végétales d'au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon
25 l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri
30 d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de

l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales ou plantes transformés et contenant un gène chimère défini ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, 5 US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 10 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

15 La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre, le riz et le 20 maïs ou dicotylédones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle, etc.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent contenir d'autres gènes d'intérêt, conférant aux plantes de nouvelles propriétés agronomiques. Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer 25 les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une tolérance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128. On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou 30 encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés ([1]; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ;

WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des
5 gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la
10 drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Ces autres gènes d'intérêt peuvent être combinés au gène chimère selon l'invention soit par croisement conventionnel de deux plantes contenant chacune l'un des gènes (la première le gène chimère selon l'invention et la seconde le gène codant pour la protéine d'intérêt) soit en effectuant la transformation de cellules végétales
15 d'une plante contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt avec le gène chimère selon l'invention.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont
20 données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology"
25 Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al ou dans Sambrook et al 1989.

Description de la figure 1 : Cinétiques d'activités GUS (1A) correspondant à la construction promoteur COMTII(-1215 à +24)/GUS et COMTII (1B) au cours d'une infection virale (VMT) ou lors d'une blessure.

Exemple 1 : Isolement du gène COMT de classe II

30 Le criblage d'une banque génomique de tabac a permis d'isoler 6 clones différents contenant des gènes de COMT de classe II (COMTII). Ces derniers ont d'abord été caractérisés par leurs profils de restriction qui ont révélé une certaine hétérogénéité

parmi les différents clones.

Les COMTII forment une famille multigénique composée de six à sept gènes dont un seul est transcrit dans les réactions de défense puisqu'un seul type d'ADNc a été caractérisé dans une banque élaborée à partir de feuilles inoculées par le virus de la mosaïque du tabac (VMT) (Pellegrini & al. 1993). Afin d'identifier le ou les clones renfermant le gène exprimé lors des réactions de défense, des réactions PCR ont été réalisées en utilisant des amorces dérivées de la région 3' non codante de l'ADNc. Dans des conditions de sélectivité élevée un seul clone est alors amplifié. Les produits d'amplifications ont été séquencés. Les séquences obtenues ont présenté une homologie parfaite avec celles des régions 3' non codantes de l'ADNc.

Exemple 2 : Analyse des séquences du promoteur de gène de la COMT de classe II

Le clone génomique retenu a été sous-cloné dans un vecteur bactérien (puc 18) et représente un insert de 14 kb dont 9 kb sont situés en amont de l'ATG du gène COMTII.

Le site d'initiation de la transcription a été déterminé par la technique d'extension d'amorce et il se place à 90 nucléotides du site d'initiation de la traduction.

Le promoteur a été séquencé sur une longueur de 1771 kilobases. Des éléments non spécifiques et communs aux gènes eucaryotes impliqués dans l'initiation de la transcription tels la TATA box et la CAT box ont été retrouvés dans le promoteur COMTII (SEQ ID NO 1). Des sites de régulation ont été mis en évidence par comparaison des séquences promotrices du gène COMTII avec celles de gènes intervenant dans les mécanismes de défense. Le promoteur COMTII contient des éléments spécifiques des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes impliqués dans la réponse au stress comme les trois boîtes P, A, L (initialement identifiées dans le gène PAL de persil) (SEQ ID NO 1). Ces trois boîtes sont impliquées dans la réponse aux éliciteurs et les boîtes P et L sont également impliquées dans la réponse aux UV. La boîte E initialement identifiée dans le gène de la CCoAOMT de persil et extrêmement conservée dans les gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes joue aussi un rôle dans la réponse aux éliciteurs.

Le promoteur COMTII possède également des éléments jouant un rôle important dans l'induction de gènes PR par les éliciteurs telle la boîte W (SEQ ID NO 1).

Des éléments régulateurs généraux sont retrouvés dans le promoteur de la COMTII telles les boîtes G, GT et l'élément activateur du virus simiens SV40 (SEQ ID NO 1). La boîte G est un élément présent dans une grande variété de promoteurs végétaux. La boîte G, associée à des éléments cis spécifiques, est impliquée dans la
5 régulation de nombreux gènes répondant à différents signaux physiologiques et environnementaux. La région promotrice, responsable de la régulation de gènes par le méthyle jasmonate, est constituée d'une boîte G associée à des séquences riches en nucléotides C. Une organisation similaire est retrouvée au niveau du promoteur de gènes
10 spécifiquement induits lors de la blessure. Les boîtes L, présentes dans le promoteur de la COMTII, pourraient intervenir dans ce genre d'interactions car ce sont des motifs riches en nucléotides C.

Les boîtes GT, représentées plusieurs fois dans les promoteurs, semblent jouer un rôle dans la modulation de l'expression de certains gènes végétaux, soit en tant qu'activateur ou en tant que répresseur.

15

Exemple 3 : Analyse fonctionnelle des régions promotrices du gène COMTII

L'analyse fonctionnelle du promoteur COMTII a été réalisée par transgénèse en expression stable. Le transgène a été obtenu par fusion transcriptionnelle entre le promoteur et un gène rapporteur, le gène GUS (β -glucuronidase). Quatre constructions
20 correspondant à différentes délétions du promoteur ont été réalisées afin de préciser la nature des séquences promotrices importantes responsables de la régulation du gène. Ces constructions correspondent aux séquences promotrices de -1215 à +24 paires de bases (bp), de -420 à +24 bp, de -313 à +24bp et de -121 à +24 bp (par rapport au site +1 de la transcription), 557 à 1795, 1352 à 1795, 1459 à 1795 et 1651 à 1795
25 respectivement sur la SEQ ID NO 1 introduites en amont du gène GUS dans le vecteur pBi101 (Clontech).

Les différentes constructions ont été introduites via *Agrobacterium tumefaciens* dans le génome des plantes. Une population d'une dizaine de plants de tabac transformés a été régénérée pour chaque construction. Le niveau d'expression du transgène a été
30 déterminé par dosage de l'activité enzymatique et par des tests histochimiques. Parallèlement l'expression des gènes COMTII a été analysée par mesure de l'activité des enzymes correspondantes.

Résultats:

L'activité GUS a été testée dans ces plantes dans différentes conditions d'induction des réactions de défense, par un éliciteur fongique injecté dans les feuilles (mégaspermine), ou après exposition aux UV. Les résultats obtenus sont rapportés dans les Tableaux 1 et 2 ci-dessous. L'activité GUS est exprimée en pmole MU/min. mg. Pour le Tableau 1, le témoin (T) est constitué par l'infiltration d'eau dans les feuilles des plantes transformées. Des plantes contrôles transformées avec un vecteur vide avaient une activité d'environ 10-30 pmoles/min.mg. Pour le Tableau 2, le témoin (T) correspond à l'activité GUS basale dans les plantes non traitées.

Tableau 1 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction par la mégaspermine

Construction COMT II/GUS	Activité GUS	
	T	Mégaspermine
COMT II -1215 à +24	150	1150
COMT II -420 à +24	2	6
COMT II -313 à +24	0,4	0,8
COMT II -121 à +24	0,2	0,8

Tableau 2 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction aux UV

Construction COMT II/GUS	Activité GUS	
	T	UV
COMT II -1215 à +24	90	900
COMT II -420 à +24	10	12
COMT II -313 à +24	10	11
COMT II -121 à +24	11	10

Ces résultats montrent que la taille du promoteur doit être supérieure à 600pb, en l'occurrence 1239 bp pour permettre l'induction et une forte expression du gène GUS. Les délétions du promoteurs correspondant aux constructions (-420 à +24), de (-313 à +24) et de (-121 à +24) provoquent une perte complète de l'expression du gène GUS dans toutes les conditions testées. L'activité du gène GUS sous le contrôle du promoteur de 1239 pb est 1000 fois supérieure à celle observée pour les autres constructions.

Activation du promoteur de la COMTII par la blessure et le méthyle jasmonate et par des éliciteurs d'origine et de nature variées.

Les plantes transgéniques possédant la construction COMTII(- 1215 à +24)/GUS ont été traitées avec différents produits chimiques, régulateurs des réactions de défense, par l'acide salicylique (SA) et le méthyl-2-6-dichloroisonicotinique (INA), par des éliciteurs fongiques comme des glucanes ou des fragments de chitine et un éliciteur d'origine végétale comme la pectine. L'activité GUS a été mesurée dans les feuilles 16h après infiltration de ces composés et les résultats rapportés dans le Tableau 3 ci-dessous. L'activité GUS est exprimée en pmole MU/min.mg. Le témoin (T) correspond à l'activité GUS basale dans les plantes transformées non traitées.

Tableau 3 - Induction de l'activité GUS par des éliciteurs

	Activité GUS	Induction %
T	600	100
H2O	1200	200
SA (1mM)	1200	200
INA (1mM)	1700	200
Chitines (100µg/ml)	1200	200
Glucanes (200µg/ml)	1400	200
Pectines (200µg/ml)	3700	600

L'augmentation la plus forte de l'activité GUS (de l'ordre de 3) est obtenue dans les plantes infiltrées par des fragments pectiques par rapport au contrôle.

L'induction du promoteur de 1239 pb a été étudiée lors de la blessure ou après traitement par le méthyle jasmonate (molécule jouant un rôle dans la signalisation des réponses de défense lors de la blessure) et par le benzothiadiazole (BTH) (inducteur chimique de la SAR). L'activité GUS est mesurée 16h après traitement. Les résultats sont rapportés sur le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 - Induction de l'activité GUS par différents composés et stress

	Induction de l'activité GUS %
T	100
BTH	250

Blessure	600
Méthyle jasmonate	1450
UV	1000

Le témoin (T) correspond à l'activité GUS des plantes non traitées. Le promoteur est activé par les différents traitements.

Les facteurs d'induction varient de 2,5 (BTH) à 14,5 (méthyle jasmonate).

Activation du promoteur de la COMTII lors de l'infection virale.

- 5 L'inoculation du VMT chez le tabac nécessite la production de micro blessures au niveau des feuilles permettant l'entrée du virus et sa multiplication. L'activité GUS et l'activité COMTII ont été mesurées dans les feuilles blessées et dans les feuilles inoculées par le virus. Les résultats (figure 1) montrent que le gène GUS sous le contrôle du promoteur COMTII a une cinétique d'induction identique à celle du gène
- 10 COMTII endogène, suivie par la mesure de l'activité catalytique des protéines correspondantes. Le promoteur COMTII est induit précocement par la blessure et présente un maximum d'activité à 16h. Le même pic d'activité est observé à 16h au cours de l'infection virale et est dû à la blessure des feuilles provoquée par l'inoculation du virus. Dans les feuilles inoculées, l'activité GUS est fortement stimulée à partir du
- 15 3ème jour et progresse jusqu'au 7ème jour. L'induction locale et systémique du promoteur lors de l'infection virale a été mesurée à 3 et 7 jours après l'inoculation du VMT. Les activités GUS exprimées en pmol MU/min.mg, sont rapportées dans le Tableau 5 et représentent une moyenne des valeurs obtenues dans 9 transformants. Le témoin T correspond à l'activité GUS des plantes non traitées.

Tableau 5 - Induction locale et systémique (SAR) de l'activité GUS

	Activité GUS
T	700
Feuilles inoculées après 3 jours	3800
Feuilles inoculées après 7 jours	7100
Feuilles SAR après 7 jours	2700

Ces résultats montrent une induction de 1100% du promoteur à 7 jours dans les 5 feuilles inoculées. L'activité GUS mesurée à 7 jours dans les feuilles SAR est plus faible mais très significative. Cependant, dans les feuilles non inoculées les facteurs d'induction calculés à partir des activités GUS sont plus fortes que celles obtenues à partir des activités COMTII (Tableau 6). Ceci est dû, d'une part au fait que le test d'activité GUS est plus sensible que celui de la COMTII et, d'autre part au fait que la 10 protéine GUS est extrêmement stable et que l'activité GUS mesurée correspond à une accumulation de cette protéine après le traitement. La comparaison des activités GUS et COMTII est rapportée dans le Tableau 6 ci-dessous. Les feuilles non inoculées où se développe la résistance systémique acquise sont appelées " feuilles SAR ".

Tableau 6 –Facteurs d'induction des activités GUS et COMTII 3 et 7 jours
15 **après inoculation par le VMT dans les feuilles infectées et les feuilles SAR**

	Induction des activités GUS		Induction des activités COMTII	
	Feuilles Inoculées	Feuilles SAR	Feuilles Inoculées	Feuilles SAR
3 jours	5,8	-	5,8	-
7 jours	11	3,9	15	1,8

Analyse histochimique de l'activité GUS lors d'une infection virale et après blessure.

Une analyse histochimique de l'activité GUS dans des feuilles inoculées par le 20 VMT, 7 jours après virose, montre que l'expression du gène GUS est localisée dans les cellules entourant le site d'infection. Des coupes transversales des feuilles au niveau des lésions ont été réalisées afin de déterminer les types cellulaires impliqués et, montrent que l'induction du gène GUS n'est pas tissu spécifique mais concerne toutes les cellules

autour des lésions.

L'analyse histochimique de l'expression du gène GUS dans des feuilles blessées, 2 jours après traitement, montre une induction du gène GUS dans les tissus non blessés entourant les sites de blessure par piqûres ou à l'aide de forceps. Ces résultats impliquent qu'un signal est émis à partir des tissus blessés vers les tissus intacts induisant une expression systémique du gène GUS. Le méthyle jasmonate synthétisé dans les tissus blessés pourrait induire à distance le gène GUS, car une application exogène de méthyle jasmonate induit une activité GUS. Le test histochimique réalisé sur des feuilles issues de plantes transgéniques 35S/GUS est le contrôle positif de l'expérience. Des coupes transversales de feuilles blessées montrent également que tous les types cellulaires sont induits par la blessure.

Activité de fragments du promoteur de taille variable et compris entre les bases -1215 et - 406.

Liste des construits possédant le gène rapporteur GUS sous contrôle des séquences promotrices comprises entre -1215 et - 406 (par rapport au site + 1 d'initiation de la transcription) :

Constructions contrôles :

Gène rapporteur GUS dépourvu de promoteur

Gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur minimum du RNA 35 S du CaMV (p min).

Constructions COMTII / GUS utilisées :

COMT II - 956 à + 24

COMT II - 937 à + 24

COMT II - 882 à + 24

COMT II - 746 à + 24

COMT II - 676 à + 24

COMT II - 560 à + 24

COMT II - 435 à + 24

COMT II - 1073 à - 406 + promoteur minimum du RNA 35 S du CaMV (p min).

Ces constructions correspondent respectivement aux fragments 815 à 1795, 834 à 1795, 889 à 1795, 1025 à 1795, 1095 à 1795, 1211 à 1795, 1336 à 1795 et 698 à 1365 de la SEQ ID NO 1.

L'analyse fonctionnelle de ces différentes constructions a été réalisée sur des tabacs transgéniques en expression stable.

Les études ont d'abord été réalisées sur une population d'environ 20 vitroplants ayant permis la sélection de 3 à 7 lignées par construction qui ont analysés à l'âge de 20 à 45 jours après transfert en serre.

Tableau 7 : Induction par la blessure, le méthyl jasmonate, les UV et le VMT de l'activité GUS dans des vitroplants de tabac transformés par les différentes constructions COMTII / GUS.

Constructions COMTII / GUS	Nombre de plantes répondant au signal / nombre total de plantes analysées				
	Témoin en survie	Blessure	Méthyl jasmonate	UV	VMT
COMT II - 1215 à + 24	4 / 15	3 / 7	9 / 15	10 / 15	7 / 15
COMT II - 956 à + 24	4 / 20	6 / 15	9 / 20	15 / 20	7 / 20
COMT II - 937 à + 24	0 / 20	5 / 10	0 / 20	0 / 20	8 / 20
COMT II - 882 à + 24	0 / 20	0 / 17	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 746 à + 24	0 / 20	0 / 4	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 676 à + 24	0 / 20	0 / 13	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 560 à + 24	0 / 20	0 / 8	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 435 à + 24	0 / 20	0 / 5	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 1073 à - 406	1 / 20	9 / 27	0 / 20	0 / 20	10 / 20
pBI 101 (sans promoteur)	0 / 20	0 / 5	0 / 20	0 / 20	0 / 20
p min / GUS	0 / 20	0 / 11	0 / 20	0 / 20	0 / 20

Pour tester la réponse à la blessure, des feuilles de vitroplants (âgées de 4 à 6 semaines après repiquage) ont été blessées à l'aide de pinces et l'activité histochimique GUS a été révélée 16 heures après blessure.

Pour tester la réponse à l'infection, des feuilles de vitroplants ont été inoculées avec une solution de VMT, et l'activité GUS a été révélé 7 jours après inoculation.

Les traitements par les UV et le méthyl jasmonate ainsi que le contrôle non induit ont été effectués sur des feuilles de vitroplants mises en survie dans de l'eau pendant 16 heures.

Tableau 8 : Induction de l'activité GUS par les fragments de pectine, chitine ou par la mégaspermine dans des plantes de tabac cultivées en serre et transformées par les différentes constructions COMTII / GUS

Constructions COMTII / GUS	Nombre de plantes répondant au signal / nombre total de plantes analysées		
	Pectines	Chitines	Mégaspermine
COMT II - 1215 à + 24	5 / 6	4 / 6	4 / 6
COMT II - 956 à + 24	4 / 5	4 / 5	4 / 5
COMT II - 937 à + 24	1 / 3	1 / 3	2 / 3
COMT II - 882 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 746 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 676 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 560 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 435 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 1073 à - 406	5 / 5	4 / 5	5 / 5
pBI 101 (sans promoteur)	0 / 5	0 / 5	0 / 5
p min / GUS	0 / 6	0 / 6	0 / 6

- 5 Les délétions correspondant aux constructions (-882 à + 24), (- 746 à + 24), (- 676 à + 24), (- 560 à + 24) et (- 435 à + 24) entraînent une perte complète de l'inductibilité du promoteur COMTII pour l'ensemble des stress étudiés dans les tableaux 7 et 8. Ceci indique que les séquences nécessaires à l'activité du promoteur se situent entre les bases - 1215 et - 882 par rapport au site d'initiation de la transcription.
- 10 Dans les cas de l'induction du promoteur par la blessure, le VMT, la mégaspermine, ainsi que par les fragments de pectine et de chitine, seuls les fragments de promoteur (- 956 à + 24), (- 937 à + 24) et (- 1073 à - 406) permettent l'expression de l'activité GUS. De plus, le fragment (- 1073 à - 406) permet l'induction du gène rapporteur par les différents traitements cités ci-dessus, la partie proximale du
- 15 promoteur comprise entre -406 et +24 ne s'avère donc pas indispensable à l'activité du promoteur. Le fragment -1071 à - 406 pb apparaît donc nécessaire et suffisant pour conférer la sensibilité aux inducteurs étudiés.

L'analyse de la réponse du promoteur vis à vis du méthyl jasmonate et des UV indique que seul le fragment promoteur de - 956 à + 24 pb est fonctionnel. En effet,

20 lorsque le fragment (- 1073 à - 406) est analysé hors du contexte du promoteur total (- 1215 à + 24 pb), aucune induction n'est observée. Il existe donc plusieurs régions

nécessaires à l'inductibilité du promoteur COMTII par le methyl jasmonate et les UV : la région comprise entre -956 et - 937 pb ainsi qu'une ou plusieurs régions situées dans la partie plus proximale du promoteur.

5 **Exemple 4 : Activité anti-infectieuse de COMTII/mégaspermine dans le tabac**

4.1. Clonage d'un ADNc codant pour la β mégaspermine.

 Le clonage de gènes d'élicitine tels que ceux de la parasiticéine et de la cryptogéine ont montré que ces gènes codaient pour une préprotéine (Kamoun et al., 1993 ; Panabières et al., 1995). La séquence codante de ces élicitines comprend un
10 peptide signal de 20 acides aminés, permettant leur excrétion dans le milieu extra-cellulaire suivi d'une séquence de 98 acides aminés correspondant à la protéine mature.

 La séquence protéique de la β mégaspermine, préalablement déterminée (Kauffmann S., résultats non publiés), montre une forte homologie avec celle de la cryptogéine (Kamoun et al., 1993). Nous avons émis l'hypothèse que les séquences
15 nucléotidiques des gènes correspondants pouvaient être très proches. Des amorces dérivées de la séquence nucléotidique du gène de la cryptogéine ont été synthétisées afin d'isoler par PCR un ADNc codant pour la β mégaspermine. Ces amorces se placent au niveau de la séquence codant pour le peptide signal et contiennent le codon d'initiation de la traduction. Des réactions d'amplification ont été effectuées sur les reverse
20 transcrits de *Phytophthora megasperma* en utilisant une amorce sens dérivée de la séquence nucléotidique de la cryptogéine et l'oligodT comme amorce antisens. Un fragment amplifié d'environ 450 nucléotides a été obtenu. Ce fragment a été cloné dans un vecteur bactérien afin d'être séquencé.

 L'analyse des séquences a révélé que le clone ainsi obtenu code pour une
25 préprotéine comprenant une séquence signal de 20 acides aminés et une séquence de 98 acides aminés correspondant à la β mégaspermine (SEQ ID NO 12). La séquence nucléotidique correspondant au peptide signal présente par ailleurs 100% d'identité avec celle de la cryptogéine.

 L'ADNc natif de la β mégaspermine a été fusionné d'une part au promoteur
30 COMT II et d'autre part au promoteur 35S. Le promoteur COMT II de 1239 pb a été utilisé car il possède tous les éléments régulateurs nécessaires à son induction.

4.2. Obtention des tabacs transgéniques

Des plants de tabac *Nicotiana tabacum* Samsun NN ont été transformés avec les deux constructions via *Agrobacterium tumefaciens*. Six transformants primaires pour chaque construction ont été régénérés et autofécondés. Les plantes issues de la seconde génération présentent un phénotype normal excepté certains individus possédant le gène de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S. Ces plantes présentent un délai de croissance et ont également un système racinaire peu développé. Cependant aucune nécrose tissulaire rappelant celle développée par l'infiltration foliaire et pouvant être liée à l'expression de l'élécitine n'est observée dans les plantes transgéniques.

4.3. Analyse de l'expression de la β mégaspermine dans les tabacs transgéniques.

L'expression de la β mégaspermine a été analysée dans les feuilles des plantes transgéniques possédant l'ADNc de l'élécitine sous le contrôle du promoteur 35S par Western-Blot (figure 2A) et par Northern-Blot (figure 2B). De façon surprenante, la β mégaspermine est indétectable dans tous les transformants analysés (figure 2A). Le niveau de transcription de l'élécitine a donc été examinée dans ces plantes par Northern-Blot (figure 2B). Les transcrits ont pu être détectés et le niveau d'expression varie d'un transformant à l'autre. Il apparaît que dans 2 types de plantes (E et F) la taille des transcrits est plus petite que la taille du messenger complet. Dans ce cas, l'absence de protéine pourrait être expliquée par le fait que l'ADNc est tronqué. Pour les plantes A, B, C, D la taille des transcrits correspond à celle de l'élécitine exprimée par le champignon et le taux de transcrits n'est pas négligeable, sauf pour la plante B montrant une très faible proportion de transcrits. Les plantes A qui possèdent les niveaux de transcrits les plus élevés montrent également un retard de croissance. Par la suite, seuls les transformants présentant les transcrits complets de β mégaspermine ont été testés pour leur résistance.

De la même manière, l'expression de la β mégaspermine sous contrôle du promoteur COMT II a été analysée par Western-Blot dans les feuilles des tabacs transgéniques (figure 3). L'expression a été étudiée dans les plantes saines non traitées pour déterminer le niveau de base d'expression de l'élécitine et après blessure pour analyser le niveau d'induction obtenu. Dans les tissus non traités, le niveau de la β mégaspermine est indétectable. Par contre, l'élécitine est détectée en très faible quantité dans les tissus blessés. Ceci est dû à l'activation du promoteur COMT II par la blessure.

L'accumulation de la COMT II a été également examinée dans les mêmes plantes transgéniques en utilisant des anticorps anti-COMT II. De façon surprenante la COMT II est détectée à un niveau non négligeable dans les tissus non traités, alors que normalement seule une très faible activité COMT II est détectée dans les plantes saines non transformées ou transformées avec le gène chimérique COMT II::GUS (Collendavelloo et al., 1981 ; Pellegrini et al., 1993). La COMT II est également produite en quantité plus grande dans les tissus blessés par comparaison aux plantes contrôles blessées de la même façon.

Le promoteur COMT II permet une expression induite de l'élécitine dans les tabacs transgéniques. Ceci a été vérifié pour les 6 transformants. Cependant la quantité d'élécitine détectée dans les plantes après induction est très faible. La présence de COMT II dans les plantes non traitées laisse supposer qu'une très faible quantité d'élécitine (non détectée par la méthode utilisée) est produite dans la plante saine et que cette synthèse est suffisante pour induire le gène COMT II endogène. De plus, il semblerait qu'une expression induite de l'élécitine lors de la blessure permette également une plus forte induction du gène COMT II endogène.

Par ailleurs, l'analyse de la β mégaspermine sur gel dénaturant montre une migration électrophorétique inférieure à celle de la β mégaspermine mature purifiée (figure 3). Cette différence de migration a été évaluée à 3 kD ce qui correspond à la taille du peptide signal. Ce résultat semble indiquer que le peptide signal n'a pas été clivé. Cependant il est possible que la protéine mature soit produite en plus petite quantité par les cellules végétales et que cette quantité se situe en dessous du seuil de détection sur ce Western-Blot.

L'étude de l'expression de la β mégaspermine dans des tabacs transgéniques semble indiquer qu'une expression constitutive d'élécitine ne soit pas tolérée par les plantes et par conséquent ne permette pas son accumulation dans les cellules végétales. Seule une expression induite permet une synthèse de la β mégaspermine à un niveau détectable. Ces résultats pourraient être liés au caractère toxique de la protéine.

4.4. Analyse du niveau de résistance des plantes transgéniques vis à vis de différents agents pathogènes.

Résistance antivirale.

a) Résistance vis à vis du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT).

Les tabacs transformés possèdent le gène de résistance N et réagissent donc par une HR lors de l'inoculation par le VMT. Dans ces expériences la résistance au virus est quantifiée par la mesure de la taille des lésions 7 jours après infection, lorsqu'elles ont atteint leur taille presque définitive. Plus la résistance développée par la plante est grande, plus les tailles des lésions sont petites, illustrant ainsi un confinement plus important du pathogène au site d'infection. Le promoteur du gène COMT II étant fortement induit autour des lésions lors de la HR au VMT, il devrait permettre une forte expression de la β mégaspermine au site d'infection. Pour le vérifier, les plantes transgéniques a,b,c,d,e et f exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur COMT II et les transformants A, B, C, D possédant l'ADNc de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ont été inoculés par le VMT. Les plantes témoins sont des plantes transgéniques pour le gène chimérique "promoteur COMT II::GUS".

Sept jours après virose, les lésions développées sur les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ne semblent pas différentes de celles des plantes témoins. Par contre des lésions plus petites sont observées sur les plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II par rapport à celles obtenues sur les plantes témoins.

Une analyse statistique de la taille des lésions a été effectuée en mesurant le diamètre de 100 à 150 lésions chez les plantes témoins et chez les plantes transgéniques pour la β mégaspermine. La figure 4 représente la distribution de la taille des lésions mesurées sur les plantes témoins et pour une lignée exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur 35S (plantes A) et une lignée exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur COMT II (plantes b). Cette distribution suit une courbe de Gauss ce qui autorise l'analyse statistique des résultats. Les plantes témoins présentent une taille de lésions dont la moyenne est de $3,3 \pm 0,5$ mm. La moyenne de la taille des lésions obtenue pour les plantes A n'est pas significativement différente de celle des témoins ($3,1 \pm 0,6$ mm) par contre celle obtenue pour les plantes b est fortement inférieure au témoins ($1,4 \pm 0,6$ mm). Les résultats obtenus pour chaque lignée indépendante sont regroupés sur la figure 5 et montrent que tous les transformants (plantes A, B, C et D) possédant l'ADNc de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S présentent une taille de lésions ne différant pas de celle des témoins. En revanche, toutes les plantes exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur COMT II présentent une taille

moyenne de lésions significativement inférieure à celle des plantes témoins. Cette diminution est plus ou moins importante selon les transformants. Une forte réduction, d'environ 60%, de la taille des lésions est obtenue pour les transformants COMT II::meg a, b, et f et la plus faible observée est de 36% et correspond au transformant COMT 5 II::meg e.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S présentent un niveau de résistance antiviral équivalent à celui des plantes témoins. Par contre, une résistance accrue au VMT est obtenue pour les tabacs transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le 10 contrôle du promoteur COMT II. Cependant tous les lignées transgéniques ne présentent pas le même niveau de résistance. Ceci pourrait être lié à des niveaux d'expression différents de la β mégaspermine dans ces différentes plantes transgéniques.

b) Résistance au Virus de la Mosaïque de la Luzerne (VML).

Nous avons testé la résistance des tabacs transgéniques COMT II::mégaspermine 15 vis à vis d'un autre virus, le VML, qui infecte le tabac de façon systémique. Une dizaine de jours après virose, le VML s'est propagé dans toute la plante et produit au niveau des feuilles non inoculées des symptômes de mosaïque.

Les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II choisies pour ce test correspondent à la lignée b qui présente un niveau de résistance 20 élevé au VMT. Les plantes A possédant l'ADNc de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ont été également inoculées ainsi que des plantes témoins COMT II::GUS. Pour chaque lignée transgénique, 5 plantes ont été inoculées. Nous avons examiné le phénotype des différentes plantes quinze jours après traitement. A ce stade 25 les symptômes de mosaïque sont bien développés sur les plantes COMT II::GUS. Les plantes transgéniques A montrent une mosaïque similaire aux plantes témoins. Par contre, une réduction de ces symptômes est observée dans les plantes transgéniques b.

La charge virale a été examinée dans les feuilles systémiques de même niveau (3^{ème} feuille au dessus de la feuille inoculée). Cette analyse a été effectuée par Western-Blot en utilisant des anticorps dirigés contre la coque protéique du virus (figure 6). La 30 quantité de virus présente dans les différentes plantes transgéniques est évaluée par rapport à la quantité de virus présente dans les plantes témoins. Les résultats obtenus montrent que les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur

35S ont de 10 à 15 fois moins de virus que les plantes témoins. Cette réduction de la quantité de virus peut paraître importante. Il faut savoir cependant que les quantités de virus produites dans les plantes sauvages peuvent varier dans les mêmes proportions. Par contre les plantes transgéniques exprimant la mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II contiennent 1000 à 10000 fois moins de virus que les plantes témoins. Ceci représente une réduction considérable et très significative de la charge virale.

Ces résultats suggèrent que seules les plantes transformées avec la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur inductible COMT II sont moins sensibles vis à vis d'une infection systémique virale. Ceci montre également une corrélation entre la réduction des symptômes d'infection et la diminution de la charge virale dans ces feuilles.

Résistance antifongique.

Nous avons examiné si la production d'élicitines *in planta* conférait une résistance induite vis à vis d'un champignon du sol, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Ce champignon infecte les plants de tabac par les racines envahissant le système racinaire puis vasculaire provoquant ainsi une sclérose des vaisseaux conducteurs. Les symptômes d'infection se traduisent par une pourriture noire au niveau du collet. Ce mode d'infection est difficile à mettre en oeuvre car il nécessite une concentration en zoospores adéquate et répond à des conditions strictes de température et d'humidité. Un mode "artificiel" d'inoculation consiste à appliquer après décapitation des tabacs le mycélium du champignon au niveau de la tige sectionnée. Après 7 jours les tiges sont prélevées et les symptômes d'infection sont examinés à l'intérieur des tiges.

L'inoculation a été effectuée sur 7 plantes témoins COMT II::GUS. Pour chaque lignée transgénique pour la β mégaspermine, cinq plantes ont été inoculées. Les plantes A, B, C et D possédant la construction "promoteur 35S-mégaspermine" ont été testées. Pour les plantes possédant le gène de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II, les lignées a et b présentant une forte résistance accrue au VMT ont été choisies ainsi que la lignée e présentant un niveau plus faible de résistance.

La progression des symptômes mesurée dans les tiges des plantes témoins atteint une longueur moyenne de 5,3 cm. Un ralentissement des symptômes d'infection est observé dans les tiges des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le

contrôle du promoteur 35S. Cette diminution est variable d'un génotype à l'autre (figure 7). La progression du champignon est fortement ralentie dans les plantes 35S::meg A (d=0,8cm) et plus faiblement dans les plantes 35S::meg B (d=3,8cm) par rapport aux plantes témoins (d=5,3cm). Les plantes A correspondent aux plantes qui présentent la plus forte proportion de transcrits de β mégaspermine, alors que les plantes B ont un taux très faible de transcrits codant pour l'élécitine. Ceci pourrait suggérer une corrélation entre les niveaux de transcrits d'élécitine détectés (et sans doute les niveaux de β mégaspermine produits même si ceux ci restent sous le seuil de détection) et le niveau de résistance antifongique induit.

La progression du champignon est également fortement ralentie dans les tiges des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II. Nous avons montré par ailleurs que le promoteur COMT II était induit lors de l'infection par *P. parasitica*. Les tiges des transformants COMT II::meg a, b et e sont respectivement infectées sur une longueur de 0,7 cm, 1 cm et de 3,5 cm. Les plantes a et b sont les plus résistantes à l'infection par *P. nicotianae* et correspondent également aux plantes présentant la plus forte résistance au VMT. Ainsi, il apparaît que les mêmes niveaux de résistance relatifs sont détectés avec les deux agents pathogènes testés. Nous pouvons supposer que les niveaux de résistance induits dans ces plantes sont liés au taux d'expression de l'élécitine. Une analyse des niveaux de transcrits par Northern-Blot permettrait peut être de confirmer cette hypothèse, sachant la difficulté de détecter la protéine par Western-Blot.

Ces résultats montrent que l'expression constitutive ou induite de β mégaspermine dans des tabacs transgéniques permet de conférer un niveau de résistance accru vis à vis de d'une infection fongique.

25

Résistance antibactérienne

Nous avons également testé la résistance des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II vis à vis d'une bactérie, *Erwinia carotovora*. Cette bactérie est un agent pathogène bien connu de la pomme de terre et est capable de macérer les tissus végétaux par la synthèse d'enzymes pectinolytiques. Cependant elle peut également infecter d'autres plantes tel le tabac.

30

Pour ce test, une suspension d'*E. carotovora* a été infiltrée dans les feuilles des plantes transgéniques COMT II::mégaspermine ainsi que dans les feuilles des plantes

contrôles (correspondant aux plantes transgéniques pour le gène chimérique COMT II::GUS). Une population de 7 plantes a été inoculée pour chacun des transformants. Deux jours après inoculation des bactéries, 60% des plantes contrôles (4 plantes sur 7) présentent des symptômes d'infection sévères, les feuilles inoculées sont entièrement macérées et l'infection tend à se propager au niveau de la plante entière. A l'inverse 85% des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMTII (6 plantes sur 7) sont résistantes à l'infection bactérienne.

Ces résultats montrent que l'expression induite de l'élicitrine accroît fortement la résistance vis à vis d'*E. carotovora*. Nous avons précédemment montré que le promoteur COMT II était inductible par des éliciteurs secondaires parmi lesquels les fragments pectiques. Ainsi nous pouvons supposer que les fragments pectiques produits lors de la lyse des tissus végétaux induisent le promoteur COMT II et par conséquent la synthèse de β mégaspermine. Cependant le mécanisme permettant la mise en place de la résistance antibactérienne reste encore à déterminer.

15

Matériel et méthodes

Criblage d'une banque génomique et identification du clone correspondant au gène exprimé pendant la réponse de défense.

Une banque d'ADN génomique de tabac (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) construite dans λ -EMBL3 (Clontech) a été criblée avec une sonde radioactive d'ADNc de COMT II (Pellegrini & al., 1993). Six clones génomiques positifs ont été isolés après quatre tours de purification. Ces clones purifiés ont été testés par PCR pour identifier celui qui comprend le gène COMT exprimé pendant la réponse d'hypersensibilité (HR) des feuilles de tabac au VMT. Les amorces 5' et 3' pour l'analyse PCR sont représentés par les oligonucléotides 1 et 2 ci-dessous (SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 5 respectivement) :

Oligo 1 : 5' CGTTTCGCAA TGTGATTGTA TC 3'

Oligo 2 : 5' CTCAAAATGA CATCCTTTCA TAC 3'

Ils sont dérivés de la région non traduite en 3' de l'ADNc de COMT II. L'analyse PCR est effectuée à 62 °C (température de fusion théorique) de manière à promouvoir une hybridation spécifique. Un seul clone permet l'amplification du fragment attendu de 400 paires de bases comme le fait l'ADNc employé comme contrôle positif. Le clone

30

génomique de COMT II a été purifié sur Quiagen tip selon le protocole décrit par le fabricant et sous cloné dans le site de restriction *Sall* du vecteur plasmide puc 18.

Séquençage de l'ADN.

Le séquençage de l'ADN a été effectué sur l'ADN double brin dénaturé selon la méthode de Sanger & al. (1977) en employant le kit " rhodamin dye terminator cycle ready " avec l'ADN polymérase FS ampliPac (Perkin-Elmer, P/N402078) et un séquenceur Applied Biosystems 373 (Perkin-Elmer). La séquence a été déterminée sur les deux brins avec des recouvrements en employant des amorces synthétisées à partir de séquences déjà déterminées.

10 Analyse des produits d'extension d'amorces.

La réaction d'extension des amorces a été effectuée sur l'ARN total selon la méthode décrite dans Current Protocols in Molecular Biology (Triezenberg, 1992). L'ARN total isolé de feuilles de tabacs infectées par le VMT et de feuilles de tabacs non infectées (comme contrôle négatif) a été hybridé à l'oligonucléotide suivant (SEQ ID NO 6), complémentaire de l'ARNm du COMT II et marqué à l'extrémité 5' :

Oligo 3 : 5' CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC 3'

Le produit de l'extension a été séparé sur un gel de polyacrylamide à 6 %. La localisation du site d'initiation de la transcription a été déterminée sur la base de la comigration des produits d'extension avec l'échelle de séquence de la obtenue à partir de la région correspondante du gène (Sanger & al., 1977).

Construction des plasmides.

Les versions tronquées du promoteur COMTII ont été amplifiées par PCR en employant les amorces PAS1 en 3' et PS1, PS2, PS3 et PS4 en 5' représentés ci-après (SEQ ID NO 7 à 11 respectivement), conduisant respectivement à l'amplification des fragments nucléotidiques de longueurs suivantes : -1215/+24, (nouveaux construits supérieurs à 600 bp) -420/+24, -313/+24 et -121/+24 (numérotation relative au site d'initiation de la transcription).

PAS1 : 5' GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG 3'

PS1 : 5' AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCAACAAT 3'

30 PS2 : 5' TGTTTGGTGT TATGCTTCCG TCCT 3'

PS3 : 5' AAAAAGCTTT TTTAGGATGG AGTACAGCC 3'

PS4 : 5' TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT 3'

Les construits -1728/+24, -1471/+24, -956/+24, -937/+24, -882/+24, -746/+24, -676/+24, -560/+24, -435/+24, ont été obtenus avec les amorces PAS2 en 3' et respectivement les amorces PS5, PS6, PS7, PS8, PS9, PS10, PS11, PS12 et PS13 en 5' présentées ci après (SEQ ID NO 15 à 24 respectivement):

5 PAS2: 5' CGCGGATCCC CTTTATAGAGT GTTTTTGTGA GGC 3'
 PS5 : 5' ACGCGTCGAC GTTAGGGACA ATCTATAGTG TCAC 3'
 PS6 : 5' ACGCGTCGAC GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGG 3'
 PS7 : 5' ACGCGTCGAC GCTGGTTAGG TGAAGTAAAG CATG 3'
 PS8 : 5' ACGCGTCGAC GCATGTTATA TGAGGAAAGT ACG 3'
 10 PS9 : 5' ACGCGTCGAC GCAGCCAGCA CAAGCAAATT CGC 3'
 PS10: 5' ACGCGTCGAC GACTTTAACA CACCAACTCC C 3'
 PS11: 5' ACGCGTCGAC CGGATCTAGA ATTTGGGTTC ATTC 3'
 PS12: 5' ACGCGTCGAC GTGTATACTC CACGTCTCCG GATAC 3'
 PS13: 5' ACGCGTCGAC GTTCAATGTT AGGTGTGTTT GG 3'

15 La séquence -1073/-406 qui a été placée en amont du promoteur 35S minimum a été obtenue en utilisant l'amorce PAS3 en 3' et l'amorce PS14 en 5' (SEQ ID NO 25 et 26):

PAS3 : 5' CGCGGATCCG CTTAACACCA AACACACCTA ACATTG 3'
 PS14 : 5' ACGCGTCGAC CAGTGGTGAG TTTAGCTGTC 3'

20 L'amplification a été effectuée pendant 30 cycles avec une étape initiale de 4 min à 95°C et une étape finale de 5 min à 72°C, en utilisant le clone génomique comme matrice. Chaque cycle consiste en 1 min à 95°C suivie d'1 min d'hybridation puis de 1,5-2 min à 72°C. L'étape d'hybridation est réalisée à 54°C, 59°C, 55°C, et 50°C pour amplifier, respectivement, les fragments -1215/+24, -420/+24, -313/+24 et -121/+24.
 25 Pour tous les autres fragments du promoteur, la température d'hybridation est de 60°C. Après sous-clonage dans le plasmide pGEM-T (Promega) et amplification dans E. Coli, le fragment de promoteur -1215/+24 est digéré par *Sall* et *XbaI*, les sites correspondants étant présents dans les amorces PS1 et PSA1 respectivement. Les fragments de promoteur de 420, 313 et 121 paires de bases sont digérés avec *HindIII* et
 30 *XbaI* (le site pour *HindIII* est présent dans les amorces PS2, PS3 et PS4, et le site *XbaI* dans l'amorce PAS1). Les fragments -1768/+24, -1471/+24, -956/+24, -937/+24, -882/+24, -746/+24, -676/+24, -560/+24 et -435/+24 sont digérés par *BamHI* présent dans PAS2 et PAS3 et par *Sall* présent dans les amorces PS5 à PS14. Tous les fragments sont clonés dans le plasmide pBI101 (Qiagen) de façon à créer une fusion

transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS. Tous les construits sont séquencés pour confirmer leur structure et les frontières de jonction.

Le construit constitué du promoteur 35S du CaMV en amont du gène de la mégaspermine a été obtenu en remplaçant le gène Gus par le gène de la mégaspermine
5 (SEQ ID NO 12) dans le plasmide pBi121(Clontech).

Clonage de l'ADNc de *Phytophthora megasperma*

10 10 mg d'ARN totaux de *Phytophthora megasperma* sont utilisés comme matrice pour la synthèse du premier brin. Les ARN totaux sont chauffés 3 min à 65°C, refroidis sur glace, et incubés 2 h à 42°C dans 50 ml de tampon de transcription inverse (50 mM Tris-HCL pH 8,3 - 15 mM MgCl₂ - 75 mM KCL - 1 mM DTT) contenant 1 mM de
chaque dNTP, 40 pmol d'amorce anti-sens correspondant à l'oligodT, et 20 U de transcriptase inverse d'AMV (virus de la myéloblastose aviaire). Le mélange est chauffé à 94°C pour stopper la réaction. Après précipitation du mélange réactionnel à l'éthanol, le culot est dissous dans de l'eau stérile distillée.

15 La synthèse du second brin est initiée par la Taq ADN polymérase. 1/20 du produit de transcription inverse est utilisé pour l'amplification par PCR dans 50 ml de tampon (10 mM Tris-HCL pH 8,3 - 50 mM KCL - 1,5 mM MgCl₂ - 0,01% BSA), 200 mM de dNTP, 0,1 mM d'amorces sens et anti-sens et 1 unité de Taq. L'amorce sens (5' ATGAACTTCACCGCTCTGCT 3') dérive de la séquence nucléotidique de la
20 cryptogéine, l'amorce anti-sens correspond à l'oligodT possédant les sites de restriction SstI-EcoRI-HindIII à son extrémité 5'. Le mélange réactionnel est chauffé pendant 3 min à 94°C, puis est soumis à 30 cycles de réaction comprenant chacun 3 étapes : 1 min à 94°C, 1 min à 49°C et 1 min à 72°C. Après le dernier cycle, l'élongation est poursuivie 10 min à 72°C. Le produit d'amplification obtenu est ensuite cloné dans le
25 vecteur pGEM (Promega) afin d'être séquencé.

Transformation des plantes

Les différents construits promoteur COMTII-GUS obtenus précédemment dans le plasmide pBI101 sont introduits dans une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM6000) (Rossi & al., 1993) par électroporation (Nagel & al., 1990). Les
30 plants de tabac (*Nicotiana tabacum* cv Samsun NN) sont transformés par infiltration d'*Agrobacterium* sur des plants de 10 jours (Rossi & al., 1993). Les plantes sont régénérées sur un milieu Murashige & Skoog (MS) (GIBCO BRL) supplémenté avec du

saccharose (30 g/l pour la formation des tiges et 15 g/l pour la formation des racines), de la 6-benzylaminopurine (Serva) (2 mg/ml), et de l'acide naphthalène acétique (Serva) (0,05 mg/ml). La kanamycine (150 mg/ml) est employée comme agent de sélection durant les étapes de régénération *in vitro* et de propagation. Des plantes contrôles ont été
5 préparées par transformation avec le vecteur vide pBI101 ou le vecteur p min GUS (contenant le gène rapporteur GUS sous contrôle du promoteur minimum du RNA 35 S du CaMV). Sept à 20 transformants indépendants sont régénérés pour chaque construit. Les transformants primaires sont auto fécondés et les graines F1 sont germées sur un milieu MS comprenant 300 mg/l de kanamycine.

10 **Essais enzymatiques**

La localisation histochimique du GUS dans les plantes transgéniques est effectuée selon la méthode décrite par Jefferson & al. (1987). La réaction histochimique est incubée dans l'obscurité à 37°C pendant 12 heures. Les tissus sont rincés, d'abord avec un tampon phosphate 50 mM pour terminer la réaction, puis plusieurs fois avec de
15 l'éthanol de 70% à 90% pour éliminer la pigmentation des tissus. Après la réaction histochimique, les tissus sont rincés dans l'éthanol à 70% et sont inclus dans une historésine de fixation (Jung) pour des sections transversales de feuilles. Les blocs d'historésines sont coupés avec un microtome et des photographies sont prises à un grossissement de 10 à 40 fois par un microscope binoculaire.

20 Le dosage des activités COMTII et GUS a été effectué sur 100mg de tissus. Le tissu est homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 100mM à pH 7,5 et 10 mM de DTT après addition de polyclar AT (Serva) et de quartz. Les extraits bruts sont clarifiés par centrifugation et par filtration sur de la laine de verre. La mesure des activités GUS et COMTII est effectuée sur les mêmes extraits bruts. Pour la mesure de
25 l'activité COMTII, un aliquote de l'extrait protéique est ajouté à 1 ml de tampon phosphate comprenant 100µM de catéchol, 50µM de S-adénosyl-L-méthionine tritiée ($1,5 \cdot 10^5$ cpm/ml) et incubé pendant 3 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 100µl d'acide sulfurique 9M. Le produit radioactif de la réaction, l'acide ferulique, est extrait par 5 ml d'une solution NA de scintillation (Beckman) et la radioactivité est
30 comptée sur un appareil Beckman LS 9000. La mesure fluorimétrique de l'activité GUS est effectuée sur les mêmes échantillons selon la procédure de Jefferson & al. (1987). Le contenu protéique est déterminé par la méthode de Bradford (1976) en employant les

réactifs Biorad.

Construits COMTII-meg et 35S-meg

Le vecteur pGEM (Promega) ne possédant pas les sites de clonage compatibles ceux du pBI101, une étape de sous clonage dans le vecteur Bluescript (pSK) a été
5 nécessaire. L'insert BamHI/SstI provenant du pSK::mégaspermine a été purifié pour le clonage dans le vecteur binaire pBi101 (Clontech).

Le vecteur pBi101::COMT II-GUS précédemment construit et correspondant au promoteur -1215/+24 fusionné au gène rapporteur GUS a été utilisé pour obtenir le gène chimérique *comt II-meg*. Le gène GUS est excisé par digestion du plasmide binaire par
10 BamHI et SstI. Un site SnaBI présent dans le gène GUS permet de couper celui-ci et évite qu'il se religue avec le plasmide binaire puisque aucune étape de purification du vecteur n'est effectuée. Les enzymes de restriction sont inactivées par la chaleur. L'ADN digéré est extrait par un mélange phénol : chloroforme (1 : 1), puis chloroforme : alcool isoamilique (24 : 1) et précipité à l'éthanol. L'ADN digéré est remis en suspension dans
15 de l'eau stérile et ligué avec l'insert.

Le vecteur pBi121 (Clontech) portant le gène *35S-GUS* a été utilisé pour obtenir le gène chimérique *35S-meg*. Le clonage est effectué selon la méthode décrite précédemment.

Les constructions ont été ensuite vérifiées par séquençage.

20 Plants de tabac.

Les plants de tabac transgéniques (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) sont cultivés in vitro sous un cycle de lumière de 12h(24°C)/12(20°C) pendant 5 semaines après la germination. Ils sont propagés sur un milieu MS avec addition de kanamycine (150 mg/l) comme agent de sélection. Ils sont ensuite transférés en serre et cultivés en
25 sol sous un cycle de lumière 16h/8h à 22°+2°C.

Analyse des ARN de plantes par Northern

Extraction des ARN totaux

Les tissus sont finement broyés dans de l'azote liquide, puis dans 1 à 2 volumes
30 de tampon d'extraction (0,2 M borate de sodium pH 9 - 30 mM EGTA - SDS 1% - 5 mM DTT). Le mélange est versé dans un tube contenant 1 volume de phénol/chloroforme (1:1), vortexé, puis centrifugé 10 min à 5000g. Une deuxième

extraction au phénol/chloroforme (1:1) est réalisée, suivie d'une troisième au chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Les ARN présents dans le surnageant sont spécifiquement précipités par addition de 1 volume d'une solution de LiCl (4 M) EDTA (10 mM) pendant une nuit à 0°C. Le tout est centrifugé 30 min à 10000g et le culot est
5 lavé avec une solution de LiCl (2 M), EDTA (5 mM). Les ARN totaux sont repris dans de l'eau et à nouveau précipités à l'éthanol 70%, NaCl (0,2 mM). Après centrifugation 30 min à 10000 g, le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70%, puis repris dans 50 µl d'eau. Les ARN sont dosés en mesurant l'absorbance d'une solution diluée à 260 (1 unité DO₂₆₀ = 40 µg/ml d'ARN), et leur intégrité est vérifiée par migration sur un gel
10 d'agarose non dénaturant coloré au BET.

Electrophorèse

Les ARN sont séparés sur gel d'agarose dénaturant préparé dans un tampon MOPS x1 contenant 16% de formaldéhyde. Des gels de 1,2% d'agarose (p/v) ont été utilisés. Les échantillons d'ARN sont dénaturés 15 min à 65°C en présence de 3
15 volumes de solution de dénaturation (MOPS x5 10µl, formamide 50µl, formaldéhyde 16µl) par volume d'ARN, et refroidis rapidement dans la glace. Du tampon de charge est ajouté (MOPSx1, glycérol 50 % , bleu de bromophénol 0,05 %) à raison de 1/10 du volume. Après migration dans du tampon MOPS x1, le gel peut être coloré au BET (0,5 µg/ml) 1 à 2 min, puis abondamment lavé à l'eau stérile. Les ARN sont alors visualisés
20 sous lumière UV.

"Northern Blot"

La technique du "Northern-blot" permet de détecter, parmi les ARN totaux, les messagers homologues à une sonde d'ADN radioactive. Celle ci est réalisée à l'aide du kit de "Random Priming" (Amersham) en suivant le protocole fourni.
25 10 µg d'ARN totaux de tige ou de feuille sont déposés sur gel d'agarose 1,2% (p/v) dénaturant ainsi qu'un marqueur de taille d'ARN (Promega) déposé en bordure du gel. Après migration, le gel est rincé à l'eau stérile afin d'enlever l'excès de formaldéhyde. La bande de migration correspondant au marqueur de taille est découpée, colorée au BET et photographiée.

30 Les ARN sont transférés par capillarité pendant 5 h sur une membrane de Nylon positivement chargée (Hybond N⁺, Amersham) avec du tampon SSC x20. Après transfert la membrane est rincée dans le tampon SSC x2 et les ARN sont fixés de façon

covalente sur la membrane de nylon par exposition à la lumière ultraviolette (1200 J, UV Stratalinker 2400, Stratagene). La membrane est hybridée à une sonde radioactive et traitée comme décrit dans Sambrook et al..

5 **Analyse des protéines de plantes par Western**

Extraction des protéines foliaires

L'extraction peut se faire immédiatement après la récolte ou sur des échantillons congelés. 150 g de tissus foliaires sont broyés au mortier dans du tampon acétate de sodium 0.5 M pH 5.2 contenant du 2-β-mercaptoéthanol (15 mM) et du charbon actif.

- 10 Le volume de tampon est ajusté de manière à obtenir un broyât fin et homogène. Celui-ci est ensuite filtré sur gaze puis centrifugé pendant 30 min à 15 000 g. Le surnageant constituant l'extrait brut est alors analysé.

Dosage des protéines

- La concentration protéique des extraits bruts est dosée par la méthode de
15 Bradford (1976) dans des plaques de microtitration : à 10 µl d'un extrait à tester sont ajoutés 200 µl de réactif de Bradford x1 (Biorad). 2 µl d'extrait brut de feuille sont complétés à 10 µl par du tampon. Chaque échantillon est testé trois fois. Après 5 à 10 min, la plaque est lue au spectrophotomètre MR 700 (Dynatech) avec le filtre 5 (660 nm). Le blanc est constitué de 10 µl de tampon et les valeurs sont comparées à une
20 gamme étalon réalisée avec de la sérum-albumine bovine (SAB, Sigma).

Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant

- L'analyse sur gel permet de déterminer la masse moléculaire des protéines en comparant leur mobilité relative à celles de protéines de masse moléculaire connue. A l'extrait protéique est ajouté 20% (v/v) de tampon de charge (60 mM Tris-HCl pH 6.8,
25 5% (v/v) 2-β-mercaptoéthanol, 10% (v/v) glycérol, 0.01% (v/v) bleu de bromophénol, 1% SDS). Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 1 min avant d'être déposés. Les gels (0.75 mm x 7 cm x 9 cm) sont coulés entre une plaque de verre et une plaque d'alumine. Le tampon d'électrophorèse est composé de 192 mM glycine, 25 mM Tris et 0.1% SDS. La migration verticale est réalisée dans une cuve d'électrophorèse Hoeffner à
30 une intensité de 20 mA par gel pour une tension de 100 à 160 V.

Transfert et immunodétection des protéines sur nitrocellulose (Western-Blot)

Après migration électrophorétique sur gel d'acrylamide, les protéines peuvent être transférées, en milieu liquide dans le tampon de transfert (0,16 M Tris - 1,20 M glycine), sur membrane de type nitrocellulose ou nylon PVDF (Immobilon, Millipore). Avant le transfert le gel est équilibré dans le tampon de transfert. La membrane PVDF
5 est activée 1 min dans le méthanol puis équilibrée également dans le tampon de transfert. L'électrotransfert s'effectue pendant 90 min à 150 mA.

L'immunodétection a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques dirigés contre la mégaspermine ou la protéine de coque du VML. La révélation est effectuée par chimiluminescence avec le kit ECL (Amersham).

10

Traitement des plantes.

Avant le traitement, les plantes sont conditionnées quelques jours dans une logette climatisée à $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sous une luminosité de 5000 lux et une photopériode J/N de 16h/8h. Ces conditions sont maintenues durant l'infection, à l'exception de
15 l'infection par *Erwinia carotovora*.

Inoculation du virus de la mosaïque du tabac (VMT)

Les feuilles de plants de tabac cultivées en serre et âgées de 6 semaines, sont frottées à l'aide d'un coton préalablement imbibé dans une suspension de VMT purifié (souche commune U1 0,1 à 1 $\mu\text{g/ml}$) contenant un abrasif, la célite (10 mg/ml). Les
20 feuilles de vitroplants de tabac, âgés de 6 à 7 semaines après repiquage, sont frottées à l'aide d'une spatule en verre fritté préalablement immergée dans une suspension de VMT purifié (souche commune U1 à 4 $\mu\text{g/ml}$, filtrée sur membrane de 0,45 μm) et un abrasif, la célite (10 mg / ml). Après quelques minutes de contact, les feuilles sont rincées à l'eau pour enlever l'excès de célite et de particules virales.

Inoculation du virus de la mosaïque de la luzerne (VML)

Les feuilles de plants de tabac, âgés de 6 semaines, sont frottées à l'aide d'une spatule en verre trempée dans une solution tampon contenant l'ARN viral (1 à 5 $\mu\text{g/ml}$) et un abrasif, la célite (10 mg/ml). L'inoculum par feuille (pour une plante) correspond à 200 ml de solution tampon : Kpi , pH 7,2, 0,04M, 1 ml RNAsine, DTT 1mM final,
30 Macaloïd (0,05%), ARN total de levure 0,25 mg/ml, ARN viral (1 à 5 $\mu\text{g/ml}$)

Inoculation de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

Le mycélium de *P. p. nicotianae* est cultivé sur boîte de Pétri contenant un milieu solide (milieu avoine : 100 g de graines d'avoine broyées sont mises en suspension dans 1 l d'eau distillée. Le milieu est filtré sur gaze. Le milieu est autoclavé
5 après addition de 15 g d'agar).

L'inoculation a été effectuée après décapitation des plants de tabac. La tige de plants de tabac âgés de 10 semaines est sectionnée sous le bourgeon apical. Une pastille de mycélium de *P. p. nicotianae* est prélevée en périphérie d'une culture de 7 jours sur milieu d'avoine et est déposée sur la section de la tige. La tige mise en contact avec la
10 pastille de mycélium est en capsulée dans une feuille d'aluminium afin d'éviter une dessiccation trop rapide des tissus au site d'inoculation.

Inoculation d'*Erwinia carotovora*

La souche d'*Erwinia carotovora* est mise en culture toute une nuit à 28°C dans du milieu LB. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans une solution de
15 MgSO₄ (10mM) pour obtenir une concentration bactérienne approximative de 1.10^7 cfu (colony-forming units)/ml. Les feuilles de plants de tabac âgés de 4 à 5 semaines sont infiltrées par cette suspension bactérienne. Un seul site est inoculé par feuille, en infiltrant à l'aide d'une pipette-man 50 ml de la suspension bactérienne. Les plantes sont placées ensuite en logettes en condition d'humidité élevée et à une température de 26°C
20 $\pm 1^\circ\text{C}$ pendant l'infection.

Traitement par un éliciteur : Des solutions sont infiltrées par un seringue équipée d'une aiguille fine dans le mésophyle des feuilles. Les zones infiltrées sont délimitées avec un marqueur "felt-tip". Les zones infiltrées sont récoltées 16 heures après le traitement. Les feuilles sont traitées avec une solution de β -mégaspermine, un
25 éliciteur protéique purifié d'un milieu de culture de *Phytophthora megasperma* (Kauffmann & al., 1993), ou d'oligosaccharides comme les oligomères de chitine (100 $\mu\text{g/ml}$), des fragments de glucane (200 $\mu\text{g/ml}$), et des fragments de pectines (200 $\mu\text{g/ml}$). Les plantes témoins sont infiltrées avec de l'eau.

Blessure : Des feuilles totalement développées sont blessées avec un hémostat ou
30 percées avec des aiguilles. Les feuilles blessées sont ensuite récoltées 16 ou 24 heures après blessure pour les analyses fluorimétriques ou histochimiques.

Traitement UV : La partie supérieure de plantes transgéniques âgées de 5

semaines est exposée aux rayons UV ($\lambda=254\text{nm}$) pendant 10 minutes puis les plantes sont placées dans l'obscurité jusqu'à la collecte des tissus 16 heures suivant le traitement.

Traitements chimiques : (1) Des solutions de SA (1mM) ou de INA (50mM) sont
5 infiltrées dans les feuilles de tabac en employant le protocole décrit pour le traitement par des éliciteurs. (2) Sous des conditions de culture identiques, on pulvérise sur les plantes transgéniques des solutions de SA (10mM), INA (1mM) ou BTH (50mM). Les tissus sont recueillis 16 heures après traitement. Les plantes traitées avec de l'eau sont
10 utilisées comme témoin. (3) Des plantes âgées de sept semaines ou des feuilles de vitroplants en survie sur de l'eau sont transférées dans des boîtes transparentes et hermétiques et soumises à une atmosphère de 3,5mM de MeJa (Serva). Les tissus sont prélevés à différents temps suivant le traitement. Les plantes témoins sont placées dans les mêmes boîtes sans MeJa.

15 **Références :**

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Bradford M.M. (1976). *A rapide and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem. 72,
20 248-254.
- Collendavelloo J, Legrand M, Geoffroy P, Barthelemy J & Fritig B (1981). *Purification and properties of the three o-diphenol O-methyltransferases of tobacco leaves*. Phytochemistry 20, 611-616.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987). *GUS fusions : β -glucuronidase*
25 *as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J. 6, 3901-3907.
- Kamoun S, Young M, Glascock CB & Tyler BM (1993). *A gene encoding a host-specific elicitor protein of Phytophthora: host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal pathogens*. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 15-25.
- Kauffmann S., Baillieul F., Genetet I., Kopp M. & Fritig B. (1993). *Two proteins*
30 *secreted by Phytophthora megasperma elicit and defense-related responses in tobacco*. In Mechanisms of plant defense responses, B. Fritig and M. Legrand, Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 140-143.

- Nagel R., Elliott A., Masel A., Birch R.G. & Manners J.M. (1990). *Electroporation of binary Ti plasmid vector into Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 67, 325-328.
- Panabières F, Marais A, Berre JYL, Penot I, Fournier D & Ricci P (1995).
- 5 *Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco*. Mol. Plant Microbe Interact. 8, 1995.
- Pellegrini L., Geoffroy P., Fritig B. & Legrand M. (1993). *Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco*
- 10 *(Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment*. Plant Physiol. 103, 509-517.
- Rossi L., Escudero J., Hohn B. & Tinland B. (1993). *Efficient and sensitive assay for T-DNA dependant transient gene expression*. Plant Mol. Biol. Rep. 12, 220-229.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory*
- 15 *manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sänger F., Nicklens S. & Coulson A.R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.
- Trienzenberg S.J. (1992). *Primer extension*. In Current Protocols in Molecular Biology. J. Wiley & Sons eds. 20.4.8.1

Revendications

1. Fragment d'acide nucléique comprenant un promoteur de plante inductible, caractérisé en ce que ledit promoteur inductible est constitué par le promoteur d'un gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (COMT II) de plante.
- 5 2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un promoteur de COMT II de plante.
3. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le promoteur est activé par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, les agressions chimiques, ou les agressions par pathogène,
10 un insecte ou un nématode
4. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la COMTII de plante est une COMT de plante qui n'est pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui est exprimée à la suite d'une agression mécanique, chimique, ou par un pathogène, un insecte ou un nématode.
- 15 5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la plante est une plante monocotylédone ou dicotylédone, en particulier choisie parmi le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.
6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce
20 que la plante est une plante dicotylédone, de préférence le tabac.
7. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon " start " (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.
- 25 8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1 à 7, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence de plus de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMTII, de préférence de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG.
9. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 8,
30 caractérisé en ce que le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

10. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG.

11. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

12. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la séquence nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1), les séquences capables de s'hybrider de manière sélective à ladite séquence et les séquences homologues.

13. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est constitué, par la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1796 de l'identificateur de séquence n° 1

14. Gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', caractérisé en ce que la séquence de régulation en 5' comprend le fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 13.

15. Gène chimère selon la revendication 14, caractérisé en ce que la séquence codante comprend une séquence codante pour un gène rapporteur ou une séquence codante pour une protéine d'intérêt.

16. Gène chimère selon la revendication 15, caractérisé en ce que la protéine d'intérêt est une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.

17. Gène chimère selon la revendication 16, caractérisé en ce que la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines.

18. Gène chimère selon la revendication 17, caractérisé en ce que le peptide éliciteur fongique est la mégaspermine.

19. Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce que la

mégaspermine est représentée par l'identificateur de séquence n° 13 (SEQ ID 13).

20. Gène chimère selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'ADN représentée par l'identificateur de séquence n° 14 (SEQ ID 14).

21. Gène chimère fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes
5 caractérisé en ce qu'il comprend dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur inductible, une séquence codante pour un éliciteur et une séquence de régulation en 3'.

22. Gène chimère selon la revendication 21, caractérisé en ce l'éliciteur est défini dans les revendications 17 à 19.

10 23. Gène chimère selon l'une des revendications 21 ou 22, caractérisé en ce que le promoteur inductible est choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB, le promoteur HMG2, le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou
15 le promoteur de l'amino cyclopropane carboxylate syntase (ACC synthase) de pomme.

24. Vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce qu'il contient au moins un gène chimère selon les revendications 14 à 23.

25. Procédé de transformation des cellules végétales, caractérisé en ce qu'il
20 consiste à intégrer au génome des dites cellules végétales au moins un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 23.

26. Cellules végétales transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 23.

27. Plantes transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un gène
25 chimère selon les revendications 14 à 23.

28. Plantes, caractérisées en ce qu'elles contiennent des cellules transformées selon la revendication 26 ou obtenues par le procédé selon la revendication 25.

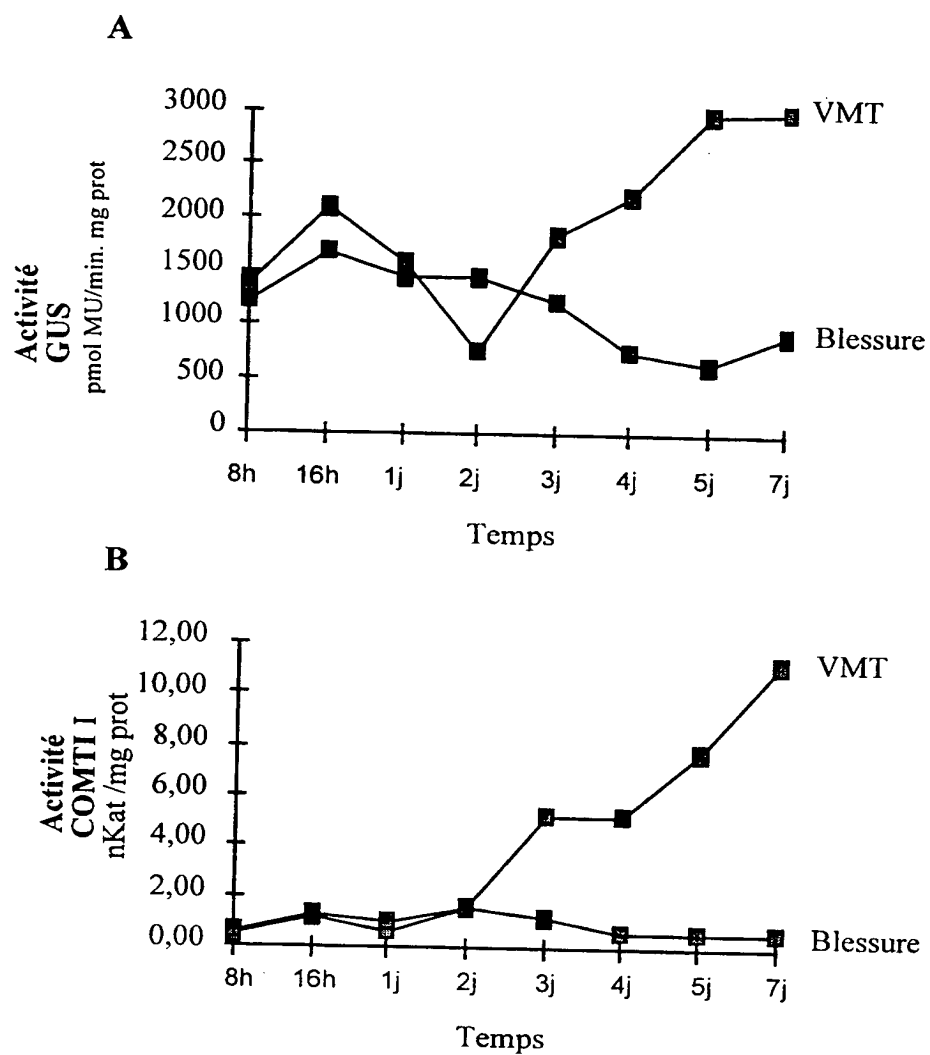
29. Plantes selon la revendication 28, caractérisées en ce qu'elles sont régénérées à partir des cellules transformées selon la revendication 19 ou obtenues par le
30 procédé selon la revendication 18.

30. Plantes issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées selon la revendication 29.

31. Plantes selon l'une des revendications 27 à 30, caractérisées en ce qu'elles sont du type monocotylédones, en particulier les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs, ou dicotylédones, en particulier le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle.

5 32. Graines des plantes selon l'une des revendications 27 à 31.

1/5

**Fig 1**

2/5

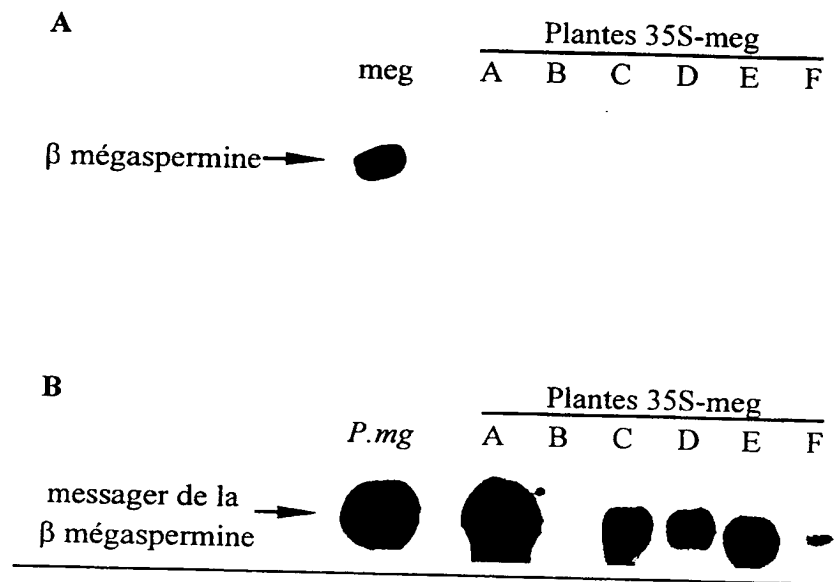


Fig 2

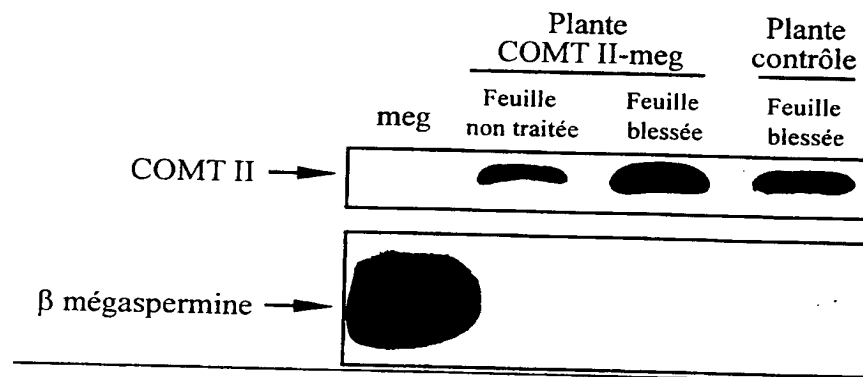
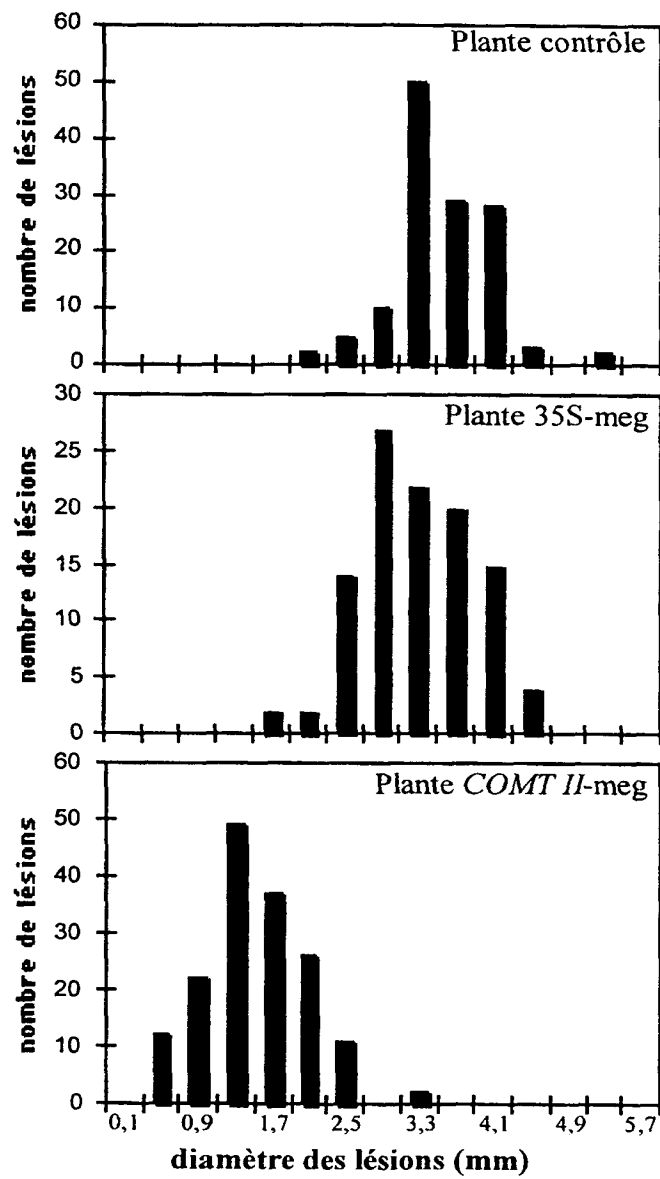
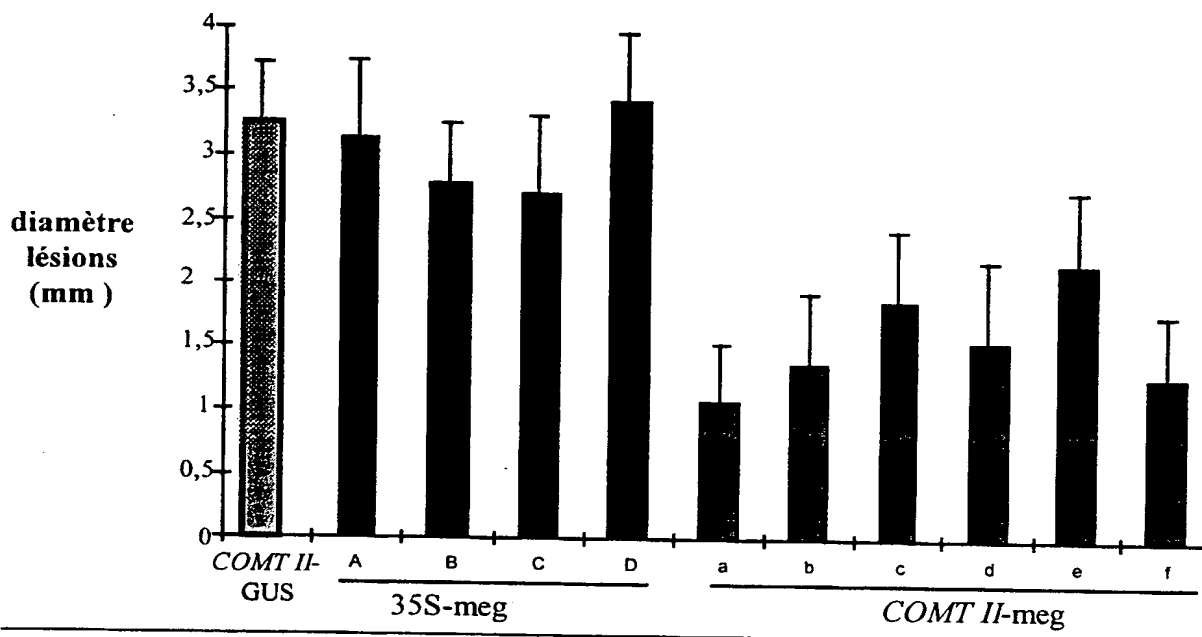
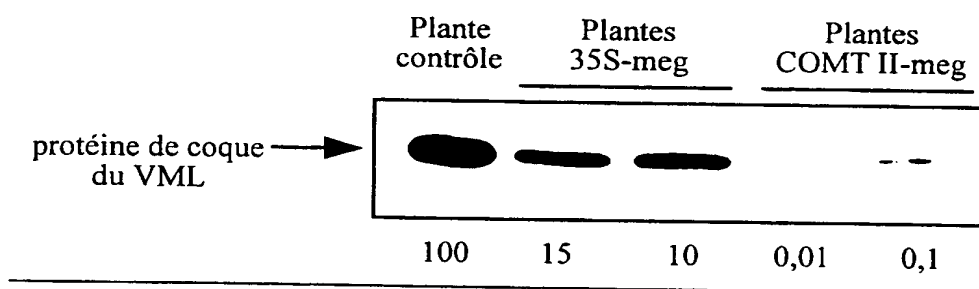


Fig 3

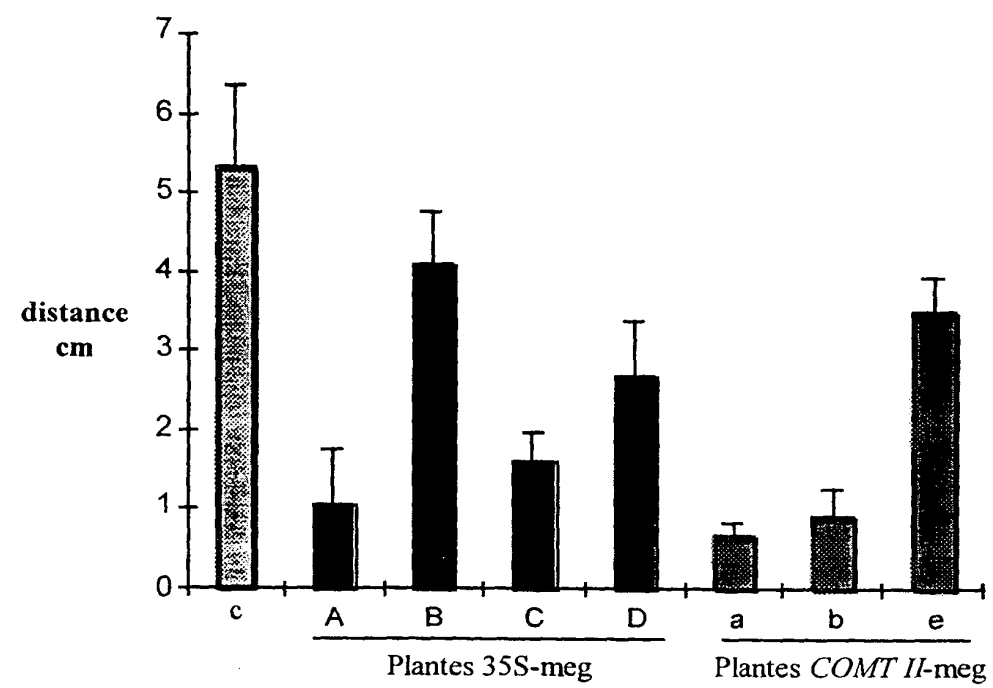
3/5

**Fig 4**

4/5

**Fig 5****Fig 6**

5/5

**Fig 7**

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHOBIO
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 26

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1863 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT:667..672
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite W inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT:820..830
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: enhancer
- (B) EMPLACEMENT:845..852

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT:1034..1047
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite P"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT:1221..1226
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite G"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal
- (B) EMPLACEMENT:1343..1356
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_signal

- (B) EMPLACEMENT:1369..1374
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite A"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: misc_signal
(B) EMPLACEMENT:1377..1382
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: misc_signal
(B) EMPLACEMENT:1483..1488
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: misc_signal
(B) EMPLACEMENT:1562..1567
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite W inverse"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: misc_signal
(B) EMPLACEMENT:1600..1614
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CAAT_signal
(B) EMPLACEMENT:1675..1679
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: misc_signal
(B) EMPLACEMENT:1681..1690
(D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite E"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: CAAT_signal
(B) EMPLACEMENT:1695..1699
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: TATA_signal
(B) EMPLACEMENT:1735..1739
- (ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: transcription origin
(B) EMPLACEMENT:1772

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA	60
AAAAGAACAG CATTTTAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTTTCATT GTATCTAGAA	120
AGAAATTGAA AAAAGAAATA TTCTATTTCA CTATTATGTT AGGTGCAACT ATATCATCAC	180
CATGGAAAAG CCGGAGTAAA AAGAGAACGT AGAGGAGATT TCATGATTTG ATTGAGAATA	240
TAATATATTA TTTTTTTGTA ATTCCACACA AAGATTAAGA AAATGATCTG ATCAATGATG	300
GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGGGAAC TAACATTAAT ATAAATTTGT CGCTGCCTAT	360
AAAGACCCTA TCTATCTATC TATCTATCTA TATATATATA TATATATATA TATATATATA	420
TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATAAG CGCTAATATT TGATTATTTT	480
TTAAAAATAT TTATAAGTAT ATATGAAATT TTTGACGAAA TTTTGTGTG ACCGTGACCC	540
CTCAACCTAT AGTGTGCGTC CACCTGTGCC AACAATATAG AGACAATTTG CTCGTATAGT	600


```

CAGAAAGAGT GTTTTACTTT TTAGTTGCTT TTTAGTGAAT CTA CTCTCGGTA TAAAGTTAAA 660
TTAGTGGGTC AATAAGTCGG GTGAATAGTT AAAGAAAACA GTGGTGAGTT TAGCTGTCAA 720
ATAATTTCTT CTTTTTCTTG TTTTCACATT AGAAATCAAA ATAAACACA AGCTTTTTGT 780
ATTTATTTTA ACACAAGCTA ATTATATGTT TATATGCTGG TTAGGTGAAG TAAAGCATGT 840
TATATGAGGA AAGTACGAAG AAAATGTGCC AATTGTCGTG TACAGCAAAG CAGCCAGCAC 900
AAGCAAATTC GCACTTGATA AGTGGCTAAG TCCACTTTCT AGTGGACCTA GTGGTTCACT 960
AACTTTTACC AAAAAGGCAA TAATTTGCAA TTCAAAAAGA AAAAAGGAAA AAAGAAAAC 1020
AGACAGACTT TAACACACCA ACTCCCACAG GAAGCAACAA TGCAACTCAC AAAAGGAAAC 1080
CGAGTTTTTC CGCGACGGAT CTAGAATTTG GGTTCATTCT TTACGCTTTT TCGTATTAAA 1140
CTCATTATAT TTGTATAATT ATGGGTTTAT ATTTTTTATT TATTGTAATT TTTGTAAAT 1200
TTTATATATA AGTGTATACT CCACGTCTCC GGATACTACA TTAGCCTCTA GGGTTCTTAA 1260
TACTCTTGTT AAATTGTCCA GGCTCCAAAC GCATGTTCTG TTCAATTTTA ACGGATGTTT 1320
CCGAACAACT CCAATGTTC AATGTTAGGT GTGTTTGGTG TTAAGCTTCC GTCCTAGGTT 1380
AATAGAATAG ATAATTGTTG TTTCTTATAT AGTTTTGAAC AATCGTCGCC ATAACTAAT 1440
TTTTAGGATG GAAGCTAATT TTTAGGATGG AGTACAGCCT AAGGTTAAAA TATAACTATA 1500
AAAAATATCC ATAAAAGGTG AAATTTAATT AGTAACATGA AAAGATAAAA CTAGTGTTAT 1560
CGGTCAAAC TTCAAAAGAG AAAGAAATAA CTAGACAAAC TTCAACAACC AACCTGCCCCA 1620
ACATGCTACT GTGCAATTGA AAAATAAACA AAAGAGAACC AGACAATATT TCAACCAATA 1680
TTCCATCAAG AAAACCAATT ATGACAATTC TTAACCAAAG TCACAATAA CACTTATAAA 1740
AAGCACTAAC TCAACTGTAC ATGATTGTGA AGCCTAACAA AAACACTCTA AAAGGAAAAG 1800
ACTACGAGAA TAATTACACT ACAACTCTTA TAGCTAATTC TTGTCTCAAG ATTTTCAGCT 1860
ATG 1863

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 5371 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: promoteur
 - (B) EMPLACEMENT: 1..1860

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: transcription origine
 - (B) EMPLACEMENT: 1772

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT:1861..2281

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: intron
(B) EMPLACEMENT:2282..3633

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: exon
(B) EMPLACEMENT:3634..3944

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: intron
(B) EMPLACEMENT:3945..4726

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: exon
(B) EMPLACEMENT:4727..5089

(ix) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: terminateur
(B) EMPLACEMENT:5090..5371

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA	60
AAAAGAACAG CATTTTAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTTTCATT GTATCTAGAA	120
AGAAATTGAA AAAAGAAATA TTCTATTTCA CTATTATGTT AGGTGCAACT ATATCATCAC	180
CATGAAAAG CCGGAGTAAA AAGAGAACGT AGAGGAGATT TCATGATTTG ATTGAGAATA	240
TAATATATTA TTTTTTTGTA ATTCCACACA AAGATTAAGA AAATGATCTG ATCAATGATG	300
GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGGGAAC TAACATTAAT ATAAATTTGT CGCTGCCTAT	360
AAAGACCCTA TCTATCTATC TATCTATCTA TATATATATA TATATATATA TATATATATA	420
TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATAAG CGCTAATATT TGATTATTTT	480
TTAAAAATAT TTATAAGTAT ATATGAAATT TTTGACGAAA TTTTGTGTG ACCGTGACCC	540
CTCAACCTAT AGTGTGCGTC CACCTGTGCC AACAATATAG AGACAATTTG CTCGTATAGT	600
CAGAAAGAGT GTTTTACTTT TTAGTTGCTT TTTAGTGAAT CTA CTGCGTA TAAAGTTAAA	660
TTAGTGGGTC AATAAGTCGG GTGAATAGTT AAAGAAAACA GTGGTGAGTT TAGCTGTCAA	720
ATAATTTCTT CTTTTTCTTG TTTTCACATT AGAAATCAAA ATAAAACACA AGCTTTTGT	780
ATTTATTTTA ACACAAGCTA ATTATATGTT TATATGCTGG TTAGGTGAAG TAAAGCATGT	840
TATATGAGGA AAGTACGAAG AAAATGTGCC AATTGTCGTG TACAGCAAAG CAGCCAGCAC	900
AAGCAAATTC GCACTTGATA AGTGGCTAAG TCCACTTTCT AGTGGACCTA GTGGTTCACT	960
AACTTTTACC AAAAAGGCAA TAATTTGCAA TTCAAAAAGA AAAAAGGAAA AAAGAAAAC	1020
AGACAGACTT TAACACACCA ACTCCCACAG GAAGCAACAA TGCAACTCAC AAAAGGAAAC	1080
CGAGTTTTTC CGCGACGGAT CTAGAATTTG GGTTCATTCT TTACGCTTTT TCGTATTAAA	1140
CTCATTATAT TTGTATAATT ATGGGTTTAT ATTTTTTATT TATTGTAATT TTTGTAAAAT	1200
TTTATATATA AGTGTATACT CCACGTCTCC GGATACTACA TTAGCCTCTA GGGTTCTTAA	1260

TACTCTTGTT	AAATTGTCCA	GGCTCCAAAC	GCATGTTTCGT	TTCAATTTTA	ACGGATGTTT	1320
CCGAACAAC	CCAAATGTTT	AATGTTAGGT	GTGTTTGGTG	TTAAGCTTCC	GTCCTAGGTT	1380
AATAGAATAG	ATAATTGTTG	TTTCTTATAT	AGTTTTGAAC	AATCGTCGCC	ATAAACTAAT	1440
TTTtaggatg	GAAGCTAATT	TTAGGATGG	AGTACAGCCT	AAGGTTAAAA	TATAACTATA	1500
AAAAATATCC	ATAAAAAGTG	AAATTTAATT	AGTAACATGA	AAAGATAAAA	CTAGTGTTAT	1560
CGGTCAAACT	TTCAAAAAGAG	AAAGAAATAA	CTAGACAAAC	TTCAACAACC	AACCTGCCCCA	1620
ACATGCTACT	GTGCAATTGA	AAAATAAACA	AAAGAGAACC	AGACAATATT	TCAACCAATA	1680
TTCCATCAAG	AAAACCAATT	ATGACAATTC	TTAACCAAAG	TCACAACATA	CACTTATAAA	1740
AAGCACTAAC	TCAACTGTAC	ATGATTGTGA	AGCCTAACAA	AAACACTCTA	AAAGGAAAAG	1800
ACTACGAGAA	TAATTACACT	ACAACCTCTA	TAGCTAATTC	TTGTCTCAAG	ATTTTCAGCT	1860
ATGGAATCCT	CAACCAAAAG	CCAAATACCA	ACACAATCAG	AAGAAGAGCG	TAAGTGCACA	1920
TATGCCATGC	AACTATTGTC	ATCTTCAGTC	CTCCCCTTTG	TGTTGCATTC	AACAATTCAA	1980
TTGGAAGTTT	TTGAGATATT	AGCCAAATCT	AATGACACTA	AACTTTCTGC	TTCTCAAATT	2040
GTTTCTCAAA	TTCTTAAGTG	CACAAAACCT	GAAGCACCTA	CTATGTTAAA	TAGGATGCTT	2100
TATGTCTTGG	CTAGTTACTC	CTTGTTTACT	TGTTCCATTG	TTGAAGATGA	AAAAAATAAT	2160
GGGGGCCAAA	AAAGAGTGTA	TGGTTTGTCA	CAAGTGGGAA	AATTCCTTGT	TAAAAATGAA	2220
AATGGTGAT	CAATGGGGCC	ACTTTTGGCT	TTGCTTCAAA	ATAAAGTATT	CATAAACAGC	2280
TGGTAAGTTT	TGTCTACTG	TGTATTCTTT	TTGCAGTGGC	TGTATTGATT	GGTTGCCTTT	2340
TTCAACAAG	AAGATTCTTA	AGTTTTATTA	CTTGTCGATT	TATGTTAGTC	GTATGTGCTA	2400
GTGTTATTAT	TCTCCATCTG	ATCCTTTTAT	TGGTCACTTT	ACCTAAAAAT	ATTGTTACAA	2460
AACATTTGTC	CTTCTAGAAA	ATCAGGTATT	ATTAATTTTT	CAATTCCATC	TTTATTACTC	2520
CAATAGTGAA	TATGGTTATT	AATTAGTGTT	TTAAGGAAGA	TGTAAGGATA	ATTTAATCAA	2580
ATAGGATTTA	TTATTAATGT	TGTCAAAGAT	TCTGGTGGAT	GGATCGGAGA	AAATTTCTTC	2640
ATCTTAATCA	GAGTTTGATG	TTGAGCCAC	AGGAATGAAT	TTGTTTTTAA	TAGGGAGTAT	2700
TTTCTCTTTG	AATAGACCTT	ACACAATAAA	AGGACAACCC	GGTACACTAA	GCTTCCGTTA	2760
TGCGCGGGGT	TCGGGGAAAG	GACCGCATCA	CCAGGTCTAT	TGTACGCAGC	GTTACCCAAC	2820
GTGAATCTAA	ATTAATGAGA	CTAAAAAATG	GAACCCAACA	CCAGTGAAAA	CCAAAAAAG	2880
AAGCAAACCT	TAGTGGATGG	CTTGGAAGA	TCTTTCTTCT	TGAATAACTT	GGAGCGCTAT	2940
ATATTAAGGC	GTCGCAGCCG	TTAGATACTT	TCAAGAAGAA	AGCTAAAAAA	TGTTTTAAAG	3000
TTACGGCGCT	AGAATAATGA	AATTTCTCTA	TATATATAAT	TCAAAGTTTA	ATAATTTATT	3060
CTCTTAACCT	AAATCTATAT	TATAAACTA	TATTAAGTAA	CTTCTGCCTA	ATTTATAATA	3120
TACAACATA	GTTTTGAGAA	AACAAAATAA	CAACAACATC	AAACCCAATG	AAATCCCACA	3180
AGTAGAGTTT	GGGGAGGATA	GTGTGTACGG	AGACCTTACC	CCTACCTTAT	AAAGTTAAAG	3240

AGGCTGTTTT	CGAAAGACTC	TCGGCTCAAG	AACATTAAAA	ATTTGAGAAA	ACAAAATATA	3300
AATTCAAAAC	CTATATTAAG	TTTATAATCC	ATGGTATATT	ATATTGGCTT	AGTAATCTGA	3360
AATGAAAGAT	TTATGTTTGA	CTCCTCTAAA	CTTGTTTTTA	ATGCAAAAGA	GGCACAACAT	3420
ATATATTATA	AGTATCTTTT	TTTGGTTTCC	CACTGTGGCC	GCTAAATTCG	GATTCGCTGG	3480
AAGTGTCAAC	TTGTTGGAGA	TGGGGGCAAC	GCTCACAACA	AAGACGATTC	TATAATTAGT	3540
GTTCTGAACCT	GAAATTTTAG	TTAAAGATAA	AGAAGTACTT	ACCATAATGG	TAGATATGAT	3600
CATATCTGAC	TCTCTTTCTA	ATTTCAAATT	ACAGGTTTGA	ACTAAAAGAT	GCAGTTCCTG	3660
AAGGAGGAGT	TCCATTTGAC	AGGGTACACG	GTGTGCATGC	ATTTGAATAT	CCAAAATCGG	3720
ACCCAAAATT	CAATGATGTT	TTCAACAAGG	CAATGATCAA	TCACACAAC	GATGTCATGA	3780
AAAAAATACT	TGAAAATTAC	AAAGGTTTTG	AGAACCTTAA	AACTTTGGTT	GATGTTGGAG	3840
GTGGTCTTGG	AGTTAACCTC	AAGATGATTA	CATCTAAATA	CCCCACAATT	AAGGGCACTA	3900
ATTTTGATTT	GCCACATGTT	GTTCAACATG	CCCCTTCCTA	TCCTGGTACC	TTCTCTCGTT	3960
CTTATTTTGT	TGTTTATTAT	ATTTACTTCG	ATCATCAGGT	CTAGGTCTGT	CAAGTTAAAT	4020
TCGTTCTCAA	AAAAGTTTAT	AAAGGTTTTG	AACTCCATCA	CCTATTGCTT	TAGGATTTTG	4080
AGTTGTATGC	TCTGAGTCTT	GCGCATGGTA	TCATAGTCAA	TTTATTTAAG	CTCGTTATTG	4140
CACTTGTGAA	TTCTATTATA	TAAGGAGTAA	GCCTACCAAA	AAGGAGCGAA	AATATTTTCC	4200
AAAACCTCTT	TTAAACCTTC	CTCACCCCAT	TCCCCTCTCC	CCTCTCCCCC	AACACCACCC	4260
ACCACCCCAA	CTCCCCCGTC	TTAGTTTTTT	TATTTATCCT	GGACTTTCTT	ATATTTTATG	4320
CTTTCCTTTA	ATTGAACTCT	TGTAACATAA	CCATTTGCCC	CCCACCCTAT	AGTGTGTTGCC	4380
TAAATTTTAT	ATTTTTCAAA	ATAATATTTT	CTATTTACTA	ATTAACATT	AGAAAATATT	4440
TTTCGGATTT	TTTTCCACTC	ACCAACCAAG	CATGGGAAAA	TAGTGATAAA	ACTACTCATT	4500
TTTCAAATA	ATATTTTCAA	GGAAAACATT	TTCTTTTATA	CCAAATACCC	TTACTCTTGT	4560
ATACAAATCT	TCATGTCGAT	GATCTTGCAA	TATATATACA	TGTATATGTA	TGATTTGATA	4620
AACCACATGA	ACAAAATGGT	TGAGCTCTGC	GAATTGTGAT	ATATGATTTG	CTTATGTGTT	4680
GTGCACTATC	AATTACTTAA	ATTAACTTTC	ATCTAATAAT	ATTGCAGGGG	TGGAACATGT	4740
TGGGGGAGAT	ATGTTTGAAA	GTGTTCCAGA	AGGAGATGCT	ATTTTTATGA	AGTGGATTCT	4800
TCATGACTGG	AGTGATAGTC	ACAACCTCAA	GTTGCTAAAG	AACTGCTACA	AGGCTCTACC	4860
AGACAATGGA	AAGGTGATTG	TTGTTGAGGC	CATTTTACCA	GTGAAACCAG	ACATTGACAC	4920
CGCAGTGGTT	GGCGTTTCGC	AATGTGATTT	GATCATGATG	GCTCAAAATC	CTGGAGGCAA	4980
AGAGCGATCG	GAAGAGGAGT	TTCGAGCCTT	GGCTACTGAA	GCTGGATTCA	AAGGCGTTAA	5040
CTTAATATGT	TGTGTCTGTA	ATTTTTGGGT	CATGGAATTC	TGCAAGTAGA	TTTCTACTGT	5100
ACATTGAGTT	TCTACTACTC	TTGAGTATCC	ATTTATGGCA	ATCTGGGACT	GGAATTGCAG	5160
CTTAGTCCAG	ATTGAACATT	GATATTCCTA	ATAATATTTT	TATTATTTCC	CTTGTTTATT	5220

TCTCTTGAT GAAAGGATGT CATTTTGAGT ATTGATAATC ATGTTCTCTA GGACAGAAAT 5280
 TGTAACCTTTG TCCAACCTTTA TTGATATTCC TAGTAAGATT TATATGACAT GTGTCTCTGG 5340
 TTTGAGAAGA GTTTCAATAT CTACAGACGG G 5371

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1095 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..1095

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG GAA TCC TCA ACC AAA AGC CAA ATA CCA ACA CAA TCA GAA GAA GAG	48
Met Glu Ser Ser Thr Lys Ser Gln Ile Pro Thr Gln Ser Glu Glu Glu	
1 5 10 15	
CGT AAC TGC ACA TAT GCC ATG CAA CTA TTG TCA TCT TCA GTC CTC CCC	96
Arg Asn Cys Thr Tyr Ala Met Gln Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro	
20 25 30	
TTT GTG TTG CAT TCA ACA ATT CAA TTG GAA GTT TTT GAG ATA TTA GCC	144
Phe Val Leu His Ser Thr Ile Gln Leu Glu Val Phe Glu Ile Leu Ala	
35 40 45	
AAA TCT AAT GAC ACT AAA CTT TCT GCT TCT CAA ATT GTT TCT CAA ATT	192
Lys Ser Asn Asp Thr Lys Leu Ser Ala Ser Gln Ile Val Ser Gln Ile	
50 55 60	
CCT AAC TGC ACA AAA CCT GAA GCA CCT ACT ATG TTA AAT AGG ATG CTT	240
Pro Asn Cys Thr Lys Pro Glu Ala Pro Thr Met Leu Asn Arg Met Leu	
65 70 75 80	
TAT GTC TTG GCT AGT TAC TCC TTG TTT ACT TGT TCC ATT GTT GAA GAT	288
Tyr Val Leu Ala Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Cys Ser Ile Val Glu Asp	
85 90 95	
GAA AAA AAT AAT GGG GGC CAA AAA AGA GTG TAT GGT TTG TCA CAA GTG	336
Glu Lys Asn Asn Gly Gly Gln Lys Arg Val Tyr Gly Leu Ser Gln Val	
100 105 110	
GGA AAA TTC TTT GTT AAA AAT GAA AAT GGT GCA TCA ATG GGG CCA CTT	384
Gly Lys Phe Phe Val Lys Asn Glu Asn Gly Ala Ser Met Gly Pro Leu	
115 120 125	
TTG GCT TTG CTT CAA AAT AAA GTA TTC ATA AAC AGC TGG TTT GAA CTA	432
Leu Ala Leu Leu Gln Asn Lys Val Phe Ile Asn Ser Trp Phe Glu Leu	
130 135 140	
AAA GAT GCA GTT CTT GAA GGA GGA GTT CCA TTT GAC AGG GTA CAC GGT	480
Lys Asp Ala Val Leu Glu Gly Gly Val Pro Phe Asp Arg Val His Gly	
145 150 155 160	
GTG CAT GCA TTT GAA TAT CCA AAA TCG GAC CCA AAA TTC AAT GAT GTT	528
Val His Ala Phe Glu Tyr Pro Lys Ser Asp Pro Lys Phe Asn Asp Val	
165 170 175	

TTC	AAC	AAG	GCA	ATG	ATC	AAT	CAC	ACA	ACT	GTA	GTC	ATG	AAA	AAA	ATA	576
Phe	Asn	Lys	Ala	Met	Ile	Asn	His	Thr	Thr	Val	Val	Met	Lys	Lys	Ile	
			180					185					190			
CTT	GAA	AAT	TAC	AAA	GGT	TTT	GAG	AAC	CTT	AAA	ACT	TTG	GTT	GAT	GTT	624
Leu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Gly	Phe	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Val	Asp	Val	
		195					200					205				
GGA	GGT	GGT	CTT	GGA	GTT	AAC	CTC	AAG	ATG	ATT	ACA	TCT	AAA	TAC	CCC	672
Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Lys	Met	Ile	Thr	Ser	Lys	Tyr	Pro	
	210					215					220					
ACA	ATT	AAG	GGC	ACT	AAT	TTT	GAT	TTG	CCA	CAT	GTT	GTT	CAA	CAT	GCC	720
Thr	Ile	Lys	Gly	Thr	Asn	Phe	Asp	Leu	Pro	His	Val	Val	Gln	His	Ala	
225					230					235					240	
CCT	TCC	TAT	CCT	GGG	GTG	GAA	CAT	GTT	GGG	GGA	GAT	ATG	TTT	GAA	AGT	768
Pro	Ser	Tyr	Pro	Gly	Val	Glu	His	Val	Gly	Gly	Asp	Met	Phe	Glu	Ser	
				245					250					255		
GTT	CCA	GAA	GGA	GAT	GCT	ATT	TTT	ATG	AAG	TGG	ATT	CTT	CAT	GAC	TGG	816
Val	Pro	Glu	Gly	Asp	Ala	Ile	Phe	Met	Lys	Trp	Ile	Leu	His	Asp	Trp	
			260					265					270			
AGT	GAT	AGT	CAC	AAC	CTC	AAG	TTG	CTA	AAG	AAC	TGC	TAC	AAG	GCT	CTA	864
Ser	Asp	Ser	His	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Asn	Cys	Tyr	Lys	Ala	Leu	
		275					280					285				
CCA	GAC	AAT	GGA	AAG	GTG	ATT	GTT	GTT	GAG	GCC	ATT	TTA	CCA	GTG	AAA	912
Pro	Asp	Asn	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Val	Glu	Ala	Ile	Leu	Pro	Val	Lys	
	290					295					300					
CCA	GAC	ATT	GAC	ACC	GCA	GTG	GTT	GGC	GTT	TCG	CAA	TGT	GAT	TTG	ATC	960
Pro	Asp	Ile	Asp	Thr	Ala	Val	Val	Gly	Val	Ser	Gln	Cys	Asp	Leu	Ile	
305					310					315					320	
ATG	ATG	GCT	CAA	AAT	CCT	GGA	GGC	AAA	GAG	CGA	TCG	GAA	GAG	GAG	TTT	1008
Met	Met	Ala	Gln	Asn	Pro	Gly	Gly	Lys	Glu	Arg	Ser	Glu	Glu	Glu	Phe	
				325					330					335		
CGA	GCC	TTG	GCT	ACT	GAA	GCT	GGA	TTC	AAA	GGC	GTT	AAC	TTA	ATA	TGT	1056
Arg	Ala	Leu	Ala	Thr	Glu	Ala	Gly	Phe	Lys	Gly	Val	Asn	Leu	Ile	Cys	
			340					345					350			
TGT	GTC	TGT	AAT	TTT	TGG	GTC	ATG	GAA	TTC	TGC	AAG	TAG				1095
Cys	Val	Cys	Asn	Phe	Trp	Val	Met	Glu	Phe	Cys	Lys					
		355					360									

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CGTTTCGCAA TGTGATTGTA TC

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTCAAAATGA CATCCTTTCA TAC

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCACAAT

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TGTTTGGTGT TATGCTTCCG TCCT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 292 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAAAAGCTTT TTTAGGATGG AGTACAGCC

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMMENT:1..60
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= preproteine

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLEMMENT:61..60
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= preproteine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

atg aac ttc acc gct ctg ctc gct gcc gtc gcc gcc gcc ttg gtc gga	48
Met Asn Phe Thr Ala Leu Leu Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Val Gly	
1 5 10 15	
tct gcc aac gcc acc gcg tgc acc gcc acc cag cag acc gct gcg tac	96
Ser Ala Asn Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr	
20 25 30	
aag aca ctc gtg agc atc ctg tcg gac gcg tcg ttc aac aag tgc tct	144
Lys Thr Leu Val Ser Ile Leu Ser Asp Ala Ser Phe Asn Lys Cys Ser	
35 40 45	
acg gat tcg gcc tac tcc atg ctg acg gcc aag gcc ctc ccc acc acg	192
Thr Asp Ser Gly Tyr Ser Met Leu Thr Ala Lys Ala Leu Pro Thr Thr	
50 55 60	

gcg cag tac aag ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg atc	240
Ala Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met Ile	
65 70 75 80	
aag aag atc gtg acg ctg aac ccg ccc aac tgc gac ctg acg gtg ccc	288
Lys Lys Ile Val Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asp Leu Thr Val Pro	
85 90 95	
acg agc ggc ctg gtg ctc aac gtg tac tcg tac gcg aac ggc ttc tcg	336
Thr Ser Gly Leu Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Ala Asn Gly Phe Ser	
100 105 110	
gac aag tgc tcg tcg ctg	354
Asp Lys Cys Ser Ser Leu	
115	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMPLACEMENT: 1..294

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

acc gcg tgc acc gcc acc cag cag acc gct gcg tac aag aca ctc gtg	48
Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr Lys Thr Leu Val	
1 5 10 15	
agc atc ctg tcg gac gcg tcg ttc aac aag tgc tct acg gat tcg ggc	96
Ser Ile Leu Ser Asp Ala Ser Phe Asn Lys Cys Ser Thr Asp Ser Gly	
20 25 30	
tac tcc atg ctg acg gcc aag gcc ctc ccc acc acg gcg cag tac aag	144
Tyr Ser Met Leu Thr Ala Lys Ala Leu Pro Thr Thr Ala Gln Tyr Lys	
35 40 45	
ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg atc aag aag atc gtg	192
Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met Ile Lys Lys Ile Val	
50 55 60	
acg ctg aac ccg ccc aac tgc gac ctg acg gtg ccc acg agc ggc ctg	240
Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asp Leu Thr Val Pro Thr Ser Gly Leu	
65 70 75 80	
gtg ctc aac gtg tac tcg tac gcg aac ggc ttc tcg gac aag tgc tcg	288
Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Ala Asn Gly Phe Ser Asp Lys Cys Ser	
85 90 95	
tcg ctg	294
Ser Leu	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 1620 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: promoteur COMTII

(B) EMPLACEMENT:1..1263

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS Mégaspermine

(B) EMPLACEMENT:1264..1630

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

```

cgtccacctg tgccaacaat atagagacaa tttgctcgta tagtcagaaa gagtgtttta 60
cttttttagtt gcttttttagt gaatctactc ggtataaagt taaattagtg ggtcaataag 120
tcgggtgaat agttaagaa aacagtgggt agtttagctg tcaaataatt tcttcttttt 180
cttgttttca cattagaaat caaaataaaa cacaagcttt ttgtatttat ttaacacaa 240
gctaattata tgtttatatg ctggtaggt gaagtaaagc atgttatatg aggaaagtac 300
gaagaaaatg tgccaattgt cgtgtacagc aaagcagcca gcacaagcaa attcgcactt 360
gataagtggc taagtccact ttctagtggc cctagtgggt cactaacttt taccaaaaag 420
gcaataattht gcaattcaaa aagaaaaaag gaaaaaagaa aactagacag actttaacac 480
accaactccc acaggaagca acaatgcaac tcacaaaagg aaaccgagtt tttccgcgac 540
ggatctagaa tttgggttca ttctttacgc tttttcgtat taaactcatt atatttgtat 600
aattatgggt ttatattttt tatttattgt aatttttgta aaattttata tataagtgtg 660
tactccacgt ctccggatac tacattagcc tctagggttc ttaatactct tgttaaattg 720
tccaggtccc aaacgcatgt tcgtttcaat ttttaacggat gtttccgaac aactccaaat 780
gttcaatggt aggtgtgttt ggtgttaagc ttccgtccta ggttaataga atagataatt 840
gttgtttctt atatagtttt gaacaatcgt cgccataaac taatttttag gatggaagct 900
aatttttagg atggagtaca gcctaagggt aaaatataac tataaaaaat atccataaaa 960
ggtgaaattht aattagtaac atgaaaagat aaaactagtg ttatcgggtc aactttcaaa 1020
agagaaagaa ataactagac aaacttcaac aaccaacctg cccaacatgc tactgtgcaa 1080
ttgaaaaata acaaaaagag aaccagacaa tatttcaacc aatattccat caagaaaacc 1140
aattatgaca attcttaacc aaagtcacaa ctaacactta taaaaagcac taactcaact 1200
gtacatgatt gtgaagccta acaaaaacac tctaaaaggc ctctagagga tccccggggt 1260

acc atg aac ttc acc gct ctg ctc gct gcc gtc gcc gcc gcc ttg gtc 1308
Met Asn Phe Thr Ala Leu Leu Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Val
  1              5              10              15

gga tct gcc aac gcc acc gcg tgc acc gcc acc cag caa acc gct gcg 1356
Gly Ser Ala Asn Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala
                20              25              30

```



```

tac aaa aca ctc gtg agc atc ctg tcg gac gcg tcg ttc aac aag tgc 1404
Tyr Lys Thr Leu Val Ser Ile Leu Ser Asp Ala Ser Phe Asn Lys Cys
      35                      40                      45

tct acg gat tcg ggc tac tcc atg ctg acg gcc aag gcc ctc ccc acc 1452
Ser Thr Asp Ser Gly Tyr Ser Met Leu Thr Ala Lys Ala Leu Pro Thr
      50                      55                      60

acg gcg cag tac aag ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg 1500
Thr Ala Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met
      65                      70                      75

atc aaa aaa atc gtg acg ctg aac ccg ccc aac tgc aac ctg acg gtg 1548
Ile Lys Lys Ile Val Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asn Leu Thr Val
      80                      85                      90                      95

ccc acg agc ggc ctg gtg ctc aac gtg tac tcg tac cca aac ggc ttc 1596
Pro Thr Ser Gly Leu Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Pro Asn Gly Phe
      100                      105                      110

tcg gac aag tgc tcg tcg ctg taa 1620
Ser Asp Lys Cys Ser Ser Leu
      115

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CGCGGATCCC CTTTGTAGAGT GTTTTGTGTA GGC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

ACGCGTCGAC GTTAGGGACA ATCTATAGTG TCAC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS6

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

ACGCGTCGAC GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGG

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS7

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

ACGCGTCGAC GCTGGTTAGG TGAAGTAAAG CATG

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS8

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

ACGCGTCGAC GCATGTTATA TGAGGAAAGT ACG

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS9

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

ACGCGTCGAC GCAGCCAGCA CAAGCAAATT CGC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS10

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

ACGCGTCGAC GACTTTAACA CACCAACTCC C

31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS11

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

ACGCGTCGAC CGGATCTAGA ATTTGGGTTC ATTC

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS12

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

ACGCGTCGAC GTGTATACTC CACGTCTCCG GATAC

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS13

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

ACGCGTCGAC GTTCAATGTT AGGTGTGTTT GG

32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

CGCGGATCCG CTTAACACCA AACACACCTA ACATTG

36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS14

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ACGCGTCGAC CAGTGGTGAG TTTAGCTGTC

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00 A01N63/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EP0-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAPELLADES M ET AL: "THE MAIZE CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTER IS ACTIVE IN TRANSGENIC TOBACCO AND MAIZE PLANT TISSUES" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412	1-11, 14, 15, 24-32
Y	the whole document --- -/--	12, 13, 16-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PELLEGRINI, LUCA ET AL: "Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O- methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment" PLANT PHYSIOL. (1993), 103(2), 509-17, XP002124694 the whole document</p> <p>-& PELLEGRINI, L.: "N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase" EMBL ACCESSION NO:X71430, 23 November 1993 (1993-11-23), XP002124695 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	12,13
X	<p>WO 96 36697 A (UNIV PENNSYLVANIA) 21 November 1996 (1996-11-21) example 15</p> <p style="text-align: center;">----</p>	21,22, 24-32
Y		16-20,23
X	<p>KELLER, HARALD ET AL: "Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance" PLANT CELL (1999), 11(2), 223-235, February 1999 (1999-02), XP002124696 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	21,22, 24-32
Y		16-20,23
Y	<p>WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 February 1995 (1995-02-09) table 3</p> <p style="text-align: center;">----</p>	23
X	<p>WO 99 09188 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ;BOERJAN WOUT (BE); CHEN CUIYING (BE) 25 February 1999 (1999-02-25) page 6 -page 9 page 17, line 5 - line 10</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-11, 14-16, 24-32
Y		17-20
X	<p>WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 March 1993 (1993-03-18) page 11, line 11 - line 24; figure 4</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-11, 14-16, 24-32
X	<p>GRIMMIG, BERNHARD ET AL: "Structure of the parsley caffeoyl -CoA O- methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element" PLANT MOL. BIOL. (1997), 33(2), 323-341, XP002054325 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-11, 14-16, 24-32
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 23, 8 June 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, LEE, J. E. ET AL: "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)" XP002124705 abstract -& LEE, J.E., ET AL.: "Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds" EMBL ACCESSION NO:U54767, 23 August 1996 (1996-08-23), XP002124698 the whole document & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363,</p>	1-11
X	<p>CHEN, C.: "Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5" EMBL ACCESSION NO:AJ223620, 4 September 1998 (1998-09-04), XP002124699 the whole document</p>	1
X	<p>SASAKI, T., ET AL.: "Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03" EMBL ACCESSION NO: AB023482, 15 March 1999 (1999-03-15), XP002141362 see reverse complement of nts 44350-44495</p>	12
A	<p>PANABIERES, F.: "P.cryptogea X24 gene for cryptogein" EMBL ACCESSION NO:Z34459, 1 December 1994 (1994-12-01), XP002124700 the whole document & PANABIERESS, F., ET AL.: "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitins, protein inducing a hypersensitive-like response in tobacco" MOL PLANT MICROBE INTERACT., vol. 8, 1995, pages 996-1003, -& PANABIERES, F.: "Beta-elcitin cryptogein precursor" SWISSPROT ACCESSION NO:P15570, 1 April 1990 (1990-04-01), XP002124701 the whole document</p>	18-20
A	<p>HUET, J.C., ET AL.: "Alpha-elicitin MGM-alpha" SWISSPROT ACCESSION NO:P35698, 1 June 1994 (1994-06-01), XP002124702 the whole document</p>	19,20
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUET, J.C., ET AL.: "Beta-elicitin MGM-beta" SWISSPROT ACCESSION NO:P35699, 1 June 1994 (1994-06-01), XP002124703 the whole document ---	19,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 March 1994 (1994-03-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 129730, KAUFFMANN, S. ET AL: "Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco." XP002124706 abstract & DEV. PLANT PATHOL. (1993), 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), 140-3, ---	18-20
A	BAILLIEUL, F., ET AL.: "A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance" THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 4, 1995, pages 551-560, XP002124704 page 552, right-hand column ---	18-20
A	WO 91 15585 A (RIJKSLANDBOUWHOGESCHOOL) 17 October 1991 (1991-10-17) the whole document -----	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00714

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9636697 A	21-11-1996	US 5981843 A AU 5732196 A BG 102047 A BR 9602338 A CA 2221348 A CN 1191565 A CZ 9703656 A EP 0828822 A ES 2134170 A HU 9802383 A JP 11505423 T PL 323383 A ZA 9603957 A	09-11-1999 29-11-1996 30-11-1998 13-01-1998 21-11-1996 26-08-1998 17-06-1998 18-03-1998 16-09-1999 28-01-1999 21-05-1999 30-03-1998 25-11-1996
WO 9503690 A	09-02-1995	AU 7518994 A CA 2168430 A EP 0712273 A JP 9503652 T SG 46678 A US 5670349 A US 5689056 A ZA 9405745 A	28-02-1995 09-02-1995 22-05-1996 15-04-1997 20-02-1998 23-09-1997 18-11-1997 14-03-1995
WO 9909188 A	25-02-1999	AU 9072298 A	08-03-1999
WO 9305160 A	18-03-1993	AU 663726 B AU 2516792 A BR 9206481 A EP 0603250 A JP 6510429 T	19-10-1995 05-04-1993 31-10-1995 29-06-1994 24-11-1994
WO 9115585 A	17-10-1991	NL 9000773 A AT 174931 T AU 642252 B AU 7684591 A CA 2056439 A DE 69130660 D DE 69130660 T EP 0474857 A EP 0874055 A ES 2128318 T GR 3029461 T JP 5505110 T PT 97230 A,B US 5866776 A	01-11-1991 15-01-1999 14-10-1993 30-10-1991 03-10-1991 04-02-1999 17-06-1999 18-03-1992 28-10-1998 16-05-1999 28-05-1999 05-08-1993 31-12-1991 02-02-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den = Internationale No

PCT/FR 00/00714

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00 A01N63/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A01H		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CAPELLADES M ET AL: "THE MAIZE CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTER IS ACTIVE IN TRANSGENIC TOBACCO AND MAIZE PLANT TISSUES" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412	1-11, 14, 15, 24-32
Y	le document en entier --- -/--	12, 13, 16-20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 30 juin 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 12/07/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Maddox, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No

PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>PELLEGRINI, LUCA ET AL: "Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O- methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment" PLANT PHYSIOL. (1993), 103(2), 509-17, XP002124694</p> <p>le document en entier</p> <p>-& PELLEGRINI, L.: "N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase" EMBL ACCESSION NO:X71430, 23 novembre 1993 (1993-11-23), XP002124695</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	12,13
X	<p>WO 96 36697 A (UNIV PENNSYLVANIA)</p> <p>21 novembre 1996 (1996-11-21)</p>	21,22, 24-32
Y	<p>exemple 15</p> <p>---</p>	16-20,23
X	<p>KELLER, HARALD ET AL: "Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance" PLANT CELL (1999), 11(2), 223-235, février 1999 (1999-02), XP002124696</p>	21,22, 24-32
Y	<p>le document en entier</p> <p>---</p>	16-20,23
Y	<p>WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP)</p> <p>9 février 1995 (1995-02-09)</p> <p>tableau 3</p> <p>---</p>	23
X	<p>WO 99 09188 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ;BOERJAN WOUT (BE); CHEN CUIYING (BE) 25 février 1999 (1999-02-25)</p>	1-11, 14-16, 24-32
Y	<p>page 6 -page 9</p> <p>page 17, ligne 5 - ligne 10</p> <p>---</p>	17-20
X	<p>WO 93 05160 A (ICI PLC)</p> <p>18 mars 1993 (1993-03-18)</p> <p>page 11, ligne 11 - ligne 24; figure 4</p> <p>---</p>	1-11, 14-16, 24-32
X	<p>GRIMMIG, BERNHARD ET AL: "Structure of the parsley caffeoyl -CoA O- methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element" PLANT MOL. BIOL. (1997), 33(2), 323-341, XP002054325</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p> <p>---</p>	1-11, 14-16, 24-32

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e Internationale No

PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 23, 8 juin 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, LEE, J. E. ET AL.: "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)" XP002124705 abrégé -& LEE, J.E., ET AL.: "Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds" EMBL ACCESSION NO:U54767, 23 août 1996 (1996-08-23), XP002124698 le document en entier & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363, ---</p>	1-11
X	<p>CHEN, C.: "Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5" EMBL ACCESSION NO:AJ223620, 4 septembre 1998 (1998-09-04), XP002124699 le document en entier ---</p>	1
X	<p>SASAKI, T., ET AL.: "Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03" EMBL ACCESSION NO: AB023482, 15 mars 1999 (1999-03-15), XP002141362 see reverse complement of nts 44350-44495 ---</p>	12
A	<p>PANABIERES, F.: "P.cryptogea X24 gene for cryptogein" EMBL ACCESSION NO:Z34459, 1 décembre 1994 (1994-12-01), XP002124700 le document en entier & PANABIERESS, F., ET AL.: "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitors, protein inducing a hypersensitive-like response in tobacco" MOL PLANT MICROBE INTERACT., vol. 8, 1995, pages 996-1003, -& PANABIERES, F.: "Beta-elcitin cryptogein precursor" SWISSPROT ACCESSIO NO:P15570, 1 avril 1990 (1990-04-01), XP002124701 le document en entier ---</p>	18-20
A	<p>HUET, J.C., ET AL.: "Alpha-elcitin MGM-alpha" SWISSPROT ACCESSION NO:P35698, 1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124702 le document en entier ---</p>	19,20
2	<p>---</p>	<p>--- -/--</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Internationale No

PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUET, J.C., ET AL.: "Beta-elicitin MGM-beta" SWISSPROT ACCESSION NO:P35699, 1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124703 le document en entier ---	19,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 mars 1994 (1994-03-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 129730, KAUFFMANN, S. ET AL: "Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco." XP002124706 abrégé & DEV. PLANT PATHOL. (1993), 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), 140-3, ---	18-20
A	BAILLIEUL, F., ET AL.: "A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance" THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 4, 1995, pages 551-560, XP002124704 page 552, colonne de droite ---	18-20
A	WO 91 15585 A (RIJKS LANDBOUW HOGESCHOOL) 17 octobre 1991 (1991-10-17) le document en entier -----	1-32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

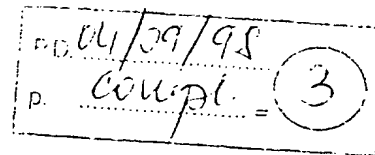
Den a Internationale No

PCT/FR 00/00714

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9636697 A	21-11-1996	US 5981843 A	09-11-1999
		AU 5732196 A	29-11-1996
		BG 102047 A	30-11-1998
		BR 9602338 A	13-01-1998
		CA 2221348 A	21-11-1996
		CN 1191565 A	26-08-1998
		CZ 9703656 A	17-06-1998
		EP 0828822 A	18-03-1998
		ES 2134170 A	16-09-1999
		HU 9802383 A	28-01-1999
		JP 11505423 T	21-05-1999
		PL 323383 A	30-03-1998
		ZA 9603957 A	25-11-1996
WO 9503690 A	09-02-1995	AU 7518994 A	28-02-1995
		CA 2168430 A	09-02-1995
		EP 0712273 A	22-05-1996
		JP 9503652 T	15-04-1997
		SG 46678 A	20-02-1998
		US 5670349 A	23-09-1997
		US 5689056 A	18-11-1997
		ZA 9405745 A	14-03-1995
WO 9909188 A	25-02-1999	AU 9072298 A	08-03-1999
WO 9305160 A	18-03-1993	AU 663726 B	19-10-1995
		AU 2516792 A	05-04-1993
		BR 9206481 A	31-10-1995
		EP 0603250 A	29-06-1994
		JP 6510429 T	24-11-1994
WO 9115585 A	17-10-1991	NL 9000773 A	01-11-1991
		AT 174931 T	15-01-1999
		AU 642252 B	14-10-1993
		AU 7684591 A	30-10-1991
		CA 2056439 A	03-10-1991
		DE 69130660 D	04-02-1999
		DE 69130660 T	17-06-1999
		EP 0474857 A	18-03-1992
		EP 0874055 A	28-10-1998
		ES 2128318 T	16-05-1999
		GR 3029461 T	28-05-1999
		JP 5505110 T	05-08-1993
		PT 97230 A,B	31-12-1991
		US 5866776 A	02-02-1999

XP-002124699

ID PTR223620 standard; DNA; PLN; 3072 BP.
 XX
 AC AJ223620;
 XX
 SV AJ223620.1
 XX
 DT 04-SEP-1998 (Rel. 56, Created)
 DT 03-AUG-1999 (Rel. 60, Last updated, Version 4)
 XX
 DE Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5
 XX
 KW caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase; CCoAOMT2 gene.
 XX
 OS Populus balsamifera subsp. trichocarpa
 OC Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 OC euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 OC core eudicots; Rosidae; eurosids I; Malpighiales; Salicaceae; Populus;
 OC Populus balsamifera.
 XX
 RN [1]
 RP 1-3072
 RA Chen C.;
 RT ;
 RL Submitted (10-FEB-1998) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
 RL Chen C., Laboratory of Genetics, University of Gent, Ledeganckstraat 35,
 RL Gent, B-9000, BELGIUM.
 XX
 RN [2]
 RA Chen C., Meyermans H., Van Doorselaere J., Van Montagu M., Boerjan W.;
 RT "A Poplar Gene for Caffeoyl Coenzyme A 3-O-Methyltransferase (accession
 RT number AJ 223620)";
 RL Plant Physiol. 117:719-719(1998).
 XX
 DR SPTREMBL; Q65922; O65922.
 XX
 FH Key Location/Qualifiers
 FH
 FT source 1..3072
 FT /db_xref="taxon:3694"
 FT /organism="Populus balsamifera subsp. trichocarpa"
 FT /cultivar="trichobel"
 FT /tissue_type="leaf"
 FT mRNA join(1364..1456,1561..1640,1787..1931,2025..2156,
 FT 2289..2582)
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT CDS join(1364..1456,1561..1640,1787..1931,2025..2156,
 FT 2289..2582)
 FT /db_xref="SPTREMBL:Q65922"
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT /product="caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase"
 FT /EC_number="2.1.1.104"
 FT /protein_id="CAA11495.1"
 FT /translation="MAANGEEQQTQAGRHOEVGHKSLLQSDALYQYILETSVYPREPEC
 FT MKELRELTAKHPWNIMTTSADEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVFTGYSLALATALAIPED
 FT GKILAMDINRENYELGLPVIQKAGLEHKIEFKEGPALPVLQDMIEDGKYHGTYDFIFVD
 FT ADKDNINYNHKLRIELVKVGGLIGYDNTLWNGSVVAPADAPMRKYVRYRDFVLELNKA
 FT LAADPRIEICMLPVGDGITLCRRIK"
 FT exon 1364..1456
 FT /number=1
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT intron 1457..1560
 FT /number=1
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT exon 1561..1640
 FT /number=2



FT /gene="CCoAOMT2"
 FT intron 1641..1786
 FT /number=2
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT exon 1787..1931
 FT /number=3
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT intron 1932..2024
 FT /number=3
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT exon 2025..2156
 FT /number=4
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT intron 2157..2288
 FT /number=4
 FT /gene="CCoAOMT2"
 FT exon 2289..2582
 FT /number=5
 FT /gene="CCoAOMT2"
 XX
 SQ

Sequence 3072 BP; 992 A; 571 C; 581 G; 928 T; 0 other;

tctagagaac	acggttttcaa	ccgcggtttcc	aaacatgatt	taaatataca	cggtatatatt	60
ttgcatttca	ataggggtttt	tgaaaaagaa	atgaatttta	tttattttatt	ttgtttttaa	120
ttatttttta	gtattttttag	atcggttttaa	catgtcaatg	tcaaaaaaaa	ttaagaaaaa	180
tattatttca	atttattttgt	aagaaaaaaa	accttaaaaa	acaattatta	ccaaaacatc	240
aaactggctc	tgaaagtatc	tcatagcata	atgcactaac	caattattta	aattttccat	300
cctgtcatgg	agaaagattc	catggttgaa	gactgtatga	taaggaaaaa	tgatcatgaac	360
tcatgggtata	agtaattttcc	tatccaataa	cagcaagctt	gatgttaggt	tagggttgat	420
ggttgtcttc	tttcatggaa	atgtttttgcc	atgccacac	gaaacaggca	agaaaaccag	480
acaatattag	gaattgtttc	aatgtattga	tattaaaaat	aaatttttaa	attaaaaaaa	540
tattatttta	atataatttat	aaataaaaaa	tacttaaaaa	aaacatctat	tacacttaaa	600
aaaaacatta	attaattact	gcctagcttt	actagaaaaa	ccacacacta	actgggcgat	660
tgaaactcca	gccatttttta	tatatattgtc	ctgtgattat	catagacggt	aaaacgaaat	720
tggatttttt	tattttgttg	gagaaaaaaa	aaagaaaaata	aatattgtca	gcagtaagac	780
ggagagattc	ttaaaaggag	tcatccattg	tcaatgcggt	ggctacgagc	caccaactcc	840
cgtggagtca	aattcttgag	gacacctcac	caacccctta	cccactttct	attagcagca	900
catgtagcca	tccccaacaa	caaagtgggt	agcccaccac	aattttctac	tctctacgat	960
ttaaatcaat	tacacgtggc	ataaaatgtc	gagcctttta	tttcaagaaa	ccaaacctaa	1020
caccgtgaac	ttaatttctt	tcgcaaatat	ctaaaaataa	ggtacatgaa	ttaaatgtat	1080
agaaattgaa	ttagtgtccg	aaacctaata	tgaccactgg	acaaacacccg	ataagtgggt	1140
cccaaaatac	ccacgggtgtc	ctaagaactc	accaaccccc	acccgggttg	aagccgggtcc	1200
aaccacccca	ctactccggc	tcaaacccga	ctctcatctc	caataaatac	cacctgccct	1260
tgccattttc	aatcagggtca	gacatcctta	ccatcgtcgc	ccccagaaaa	accttccaac	1320
gccaggaaag	agagtatagt	tttgtttata	gatatacaaa	ataatggccg	ccaacggaga	1380
ggaacagcag	actcaggccg	gaaggcatca	agaagtgtgc	cacaagagcc	ttttgcaaag	1440
tgatgctctt	taccaggtaa	tttaaccgag	aaacccctga	tcttggtgcg	agttttgttt	1500
ttttttcctt	ggtttgtttt	tttttttaaca	ttttttgtat	atatttggat	tggttttttag	1560
tatatctctg	agaccagtgt	gtacccaaga	gagcctgaat	gcatgaagga	gcttagagag	1620
ttgactgcca	agcatccttg	gtatgtttgt	tgaatcctca	catgcatttt	aaatacatca	1680
acatgagaga	ttttattttc	ataaaaaaaa	aaaaagggtt	ttgttttcta	tatatgtatg	1740
tttatggcgt	ggtgttaata	aatctgatgt	gaatgatggg	aaacaggaac	atcatgacca	1800
catctgctga	tgaagggcaa	ttcttgaaac	tgctttttaa	gcttatcaat	gccaagaaca	1860
ccatggagat	tgtgtgtttc	actggctatt	ctctcttggc	cactgctctt	gctatccctg	1920
aggatggaaa	ggtaaaaaact	aaagacctga	gattttctcg	tcccaaatca	gtcaaaagaa	1980
attagggtgac	ggttaagaaa	taattgggat	cttgtgactt	gcagatcttg	gctatggaca	2040
tcaacagaga	aaactatgaa	ctgggtctcc	cggtgattca	gaaagctggt	ctggaacaca	2100
agattgagtt	caaggaaggc	cctgctctgc	cagttctcga	tcaaattgatt	gaagatgtaa	2160
gaaatattct	gtctttgaca	aaaaaaaaaa	cattttttgt	ttgctcgtat	gagaaaagag	2220
atgatattca	tttaagaaaa	ttgatgtgct	attactaagc	ttactattct	gtgtgtggcg	2280
aaactacagg	aaagtaccat	ggaacttatg	acttcatctt	tgtggatgct	gacaaggaca	2340
attatattaa	ctaccacaag	aggttgattg	agcttgtcaa	agtcggaggg	ttgattgggt	2400
atgacaacac	cctgtggaat	ggatctgtgg	tggcaccagc	cgatgcgccca	atgaggaagt	2460
atgtgaggta	ctatagggac	tttgttctgg	agctcaataa	ggcacttgca	gctgacccca	2520
ggattggaat	ctgtgactct	cctgttggtg	atggtatcac	tctctgccgt	cggtatcaag	2580
gaggggctgc	attccctgcc	gatattatat	ataatatcaa	tggtgaccat	tgatttggtc	2640

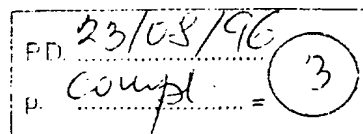
acttgcaaaa	acaagtgatg	tgtaataaaa	gagattttac	cgacottgct	tatatattgt	2700
acctgaaaga	atgggtgaatg	gccgagaaac	tccattcttg	aatttctgtc	taagtggatt	2760
ttttacgcac	ttaatccata	ttgttcttta	accaagtact	tatcacgcgg	tggtgagaat	2820
gttcatgggt	taaggagttt	gcttcaacat	tcaaaaattaa	gaagcacggg	gtcccttgct	2880
cccttacgaa	gaccactaga	tgcggttccc	attcagttaa	tggcctraag	gacgagttta	2940
tttctttttc	gttctgactt	tctgtacatg	cagcccgcac	tctctctgta	aataaaaact	3000
gctaaccgca	agtaaaaaya	tgtgtatcga	gaaagggctt	ttgcaagctt	ggccttgaac	3060
tagcgtggaa	aa					3072

//

XP-002124698

<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/emblfetch?u54767>

ID HVU54767 standard; DNA; PLN; 5238 BP.
XX
AC U54767;
XX
SV U54767.1
XX
DT 23-AUG-1996 (Rel. 49, Created)
DT 06-JUN-1998 (Rel. 56, Last updated, Version 4)
XX
DE Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene,
DE complete cds.
XX
KW .
XX
OS Hordeum vulgare (barley)
OC Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
OC euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae;
OC Hordeum.
XX
RN [1]
RP 1-5238
RX MEDLINE; 98185504.
RA Lee J.E., Kleinhofs A., Graner A., Wegener S., Parthier B., Loebler M.;
RT "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced
RT O-methyltransferase from barley";
RL DNA Seq. 7(6):357-363(1997).
XX
RN [2]
RP 1-5238
RA Lee J.E.;
RT ;
RL Submitted (11-APR-1996) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Justin E. Lee, Hormone Research, Inst of Plant Biochemistry, Weinberg 3,
RL Halle D-06120, Germany
XX
DR SPTREMBL; Q96565; Q96565.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..5238
FT /chromosome="5"
FT /db_xref="taxon:4513"
FT /organism="Hordeum vulgare"
FT /cultivar="Igri"
FT /map="between ABG500A and ABG452"
FT TATA_signal 2586..2591
FT /gene="HvCOMT"
FT mRNA join(2604..3141,3336..3649,3846..3910,4431..4817)
FT /gene="HvCOMT"
FT /product="caffeic acid O-methyltransferase"
FT CDS join(2690..3141,3336..3649,3846..3910,4431..4730)
FT /codon_start=1
FT /db_xref="SPTREMBL:Q96565"
FT /gene="HvCOMT"
FT /EC_number="2.1.1.6"
FT /product="caffeic acid O-methyltransferase"
FT /protein_id="AAC18643.1"
FT /translation="MDKISAPFFSGTSPAAASVAGVDEDDRLCFQAQELMFAYNISMVL
FT RAAIQLGLLDALSAAGGKALTPNELVENVETSSNKAEEAAAVDRILRYLSCFNVTCS
FT EAAGPDGTLVRRYTTGPLCRWLTKDRGDGTLSPFAVFVVDPDHLFPWHHIAEAVTAGGP
FT SAFERTQKWPYYEYMGKNQRLGTLFDNAMAQHSVILVTKMLERFKGFDGVQRLVDVGGG
FT TGSTLGMITSKYKHMTGINYDLPHVIAQGLPLPGVEHVAGDMYESIPTGDAVLLQWITL
FT MLNDDEFVKILSNCHNALPKDGKVIIVDVGILPENPDSSLTARDAFTLDIIMFVLFKGAK
FT QRTEKEFARLAKQAGFTGGIKKTYIFFNFYALEFTK"
FT polyA_signal 4784..4788



FT /gene="HvCOMT"
 FT polyA_signal 4796..4800
 FT /gene="HvCOMT"
 FT polyA_site 4817
 FT /gene="HvCOMT"
 XX
 SQ

Sequence 5238 BP; 1452 A; 1108 C; 1300 G; 1378 T; 0 other;

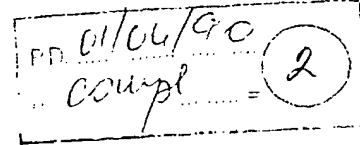
agtgcgagat	ggagaccggg	gagggcgccga	tcgtcgaggg	caaccagcgg	gcggaggtac	60
aaggcgctca	tgccgtggcg	cttccacggc	cttcgtcagg	aaccgagcca	ggagcaccgc	120
*accgcccgt	gcgcgccgcc	agggggccgcc	gcgcgggccc	gcggttcttg	gcccgaaggt	180
cccagatcgg	agtcgggtgg	ggcgagcggc	ggccgtagcg	cgagagatcg	gcggttgccc	240
ggacgaagaa	gagaatcacg	ctcgttgaga	ccatgaagag	gcgccatggg	gagtgacgca	300
tcggtgctgg	acaggatagc	cagctgaaga	gaagcacacg	aagtgcgacc	aagaactccg	360
gtgctgaaat	tgaltgccca	ttgagaagag	gcacacgtag	tgggccttcc	aagagctccg	420
catggggttc	aatagagaag	gtgactgcag	gagtgccgga	aaggatttcc	aatcgaatag	480
agacacaagc	agcacggctg	tgaacatttc	catgctatta	atatggagaa	ctagtctcct	540
accggtgctg	aaaggatttc	aaataaagag	aggccataca	cacatgagca	cgagactcca	600
atggggagaa	aatggagaac	aatgctcgca	caggtgccaa	aacggagtg	cgtttgggca	660
agtcacagcg	caatattatg	ggtgatgggt	tggccaacgc	gggtggagga	tattgttgtt	720
ttcagggggc	agactgcaac	ggtgtcgtga	gagatgaaat	tgtccaggat	tttgggactg	780
gcggcacggt	gttgggtggg	atggggcagc	ttgcatcccg	gaggattcag	agtaatgtag	840
gagctgagaa	ctatgagcct	aagggttcga	agaagtccag	tgtggccaga	aacgggttaa	900
agagcaacgt	tcttctggtg	cagatgatgt	gttggagcag	cgggagggaa	aaggtgctag	960
aacggaataa	ggggtttcaa	gaagagtgat	gtagcagcca	aaaggtgcag	ctctgcagtt	1020
cctcgaagca	atgctaata	ccgaattgc	cgagagggc	agaaagaaat	tgtgccatgg	1080
aggttccagg	ttggatacaa	gcggtcattc	tcgaaagcct	tctgctccaa	tggtgggtct	1140
cctaaaactc	cggaatacac	ggctcagggc	agctcaacac	agtgcactcc	aggaactaga	1200
agtactgtga	gatgctatgc	tacccccctt	tcaaatgtta	gagtttcggg	cccgtagccg	1260
gatttctcct	caaggaaaag	tgagaaggac	accggaacat	catataaaaa	ggtgaaagtt	1320
gaaaaggatg	acaatcaggg	aatgccaaaa	aatagagtag	cccttgctag	ggagaacgtc	1380
atcaggtcct	tgccgggattt	cagcttattt	agaagaatct	tgtgaataaa	cttgaagacc	1440
tcttgtgaat	aaacttgaag	acaggccacg	ggaaggaaag	gccgatctac	aagcttatag	1500
aatctcagcc	agaggtgccc	tgcacagtgt	aatgcagaga	gttatgttgg	ccatgtgcct	1560
ggaatccatg	tcgggtgat	ctttcgtgca	aggggtgagc	tttgcgttat	tggtcttcat	1620
tgccacacac	gttttagggat	tgatcatatc	aagaaggagg	atgatactaa	taaaggaaat	1680
aggtattcct	agtcggtcat	gatatttata	gaatccccct	gatgtttgtg	acattaaacc	1740
cgcaatacat	atcaaatgct	ttttaaaata	ataatatctt	ctaaaccata	actctaaatt	1800
taacatgtta	tatatggatt	ttgattagaa	aaatatatag	aatctaaata	tgatgttatt	1860
ttacctgtta	accattttta	aaatactatc	taggatacaa	tcttaataca	taatgcatta	1920
cacgtctttc	tttcataccg	gtaccgattt	ggattgttga	tgaatatcta	agcaaaaatca	1980
ggattagaga	aaaaaaaata	gaagatcact	tgaccgtttc	tttgatatga	ataaatccgc	2040
attcaagatc	tttttaaata	gaagacctgt	gaaatcttga	actgcgcttt	gaaggctaag	2100
atcatctttg	tttgggtagt	agctacaata	ctcaaattat	agacattttt	ttaatatctt	2160
tcaagaccga	ctgagcagtc	atcattatca	taattggtgt	tcttttggtc	atatacacia	2220
ttgcttcatg	ttttttgcag	agattaaaata	agtaaagttt	tgatgatggt	cttctggtaa	2280
gcataatgac	aatctatatg	gagtttcaat	caatttgaat	gaaagtgcac	atgtttgcac	2340
ctttactagc	actgcgatgg	cgggtgtgtg	ctgaagtaga	tgccgacgga	gggtgagcgc	2400
gggactttac	aaatataaaa	tttatgattc	aaatatgtac	aatctaacac	ggtgtaacgc	2460
aacggcactt	ttactagtat	ggctataaat	tgtacagcat	acataacatt	tgtacttttg	2520
tagcaatggg	aaaatcatta	ttcatcagat	caagatgaca	gctcatcccg	ccccctccct	2580
ctatctatat	atatggacgc	actcgcgccg	taacatatgc	agaacaggtg	cctataataa	2640
ataattctgt	tctagtagtc	caggatctat	tgaattgtga	gaggtagcca	tggaacaagat	2700
ttcagcacct	ttcttttagt	gtacgagtc	tgctgtcgtc	agtgctcccg	gagtgatga	2760
ggacgatagg	ctgtgcttcc	aagcgcaaga	gctcatgttt	gcctacaaca	tctccatagg	2820
gctcagagca	gccatccagc	tgggccctcc	agcgcactc	agtgccgctg	gtggcaaggc	2880
gctgaccccc	aacgagctcg	tagagaacgt	ggagacaagc	agcaacaagg	ccgagggcgc	2940
ggctgcgggt	gaccgtatcc	tcaggtaacct	ctcctgcttc	aacgtggtga	cctgctcttc	3000
gggggcagca	ggccctgacg	gcacacttgt	gcggcgatac	acgacgggcc	ccttgtgccc	3060
gtggctcacc	aaagacagag	gggacggcac	cctgtccccc	tttgccgtct	ttgtgttoga	3120
ccccgaccac	ttattccctt	ggtacgtatg	tgtgtatgtg	tatgcagaat	atacgatcct	3180
cctcgactgt	ttgcctctat	ttattacaaa	acactcgctc	tattttgaaa	tactttagat	3240
cgaggaactt	gcactagtct	tcccgggcta	catatatctc	agtacagagg	gagtatatca	3300
tgaaaatttg	attatacgag	tctgcacata	tgaaggcacc	atatagcaga	ggcggtgact	3360
gcggggcggc	cgtcggcggt	tgagaggacg	caaaagtgcc	cctactacga	gtacatgggg	3420
aagaaccagc	ggttggggaa	actgttcgac	aatgccatgg	ctcagcactc	tgtgatcctg	3480

gtcaccaaga	tgctcgagcg	cttcaaggga	ttcgatggtg	tgacgaggct	tgtggacgtc	3540
ggtggtggca	cgggctccac	cctagggatg	atcacctcta	agtacaagca	catgaccggc	3600
atcaactatg	acctgcctca	tgtcatcgcc	caaggcctcc	ctcttccagg	tcatcatttc	3660
accatctatg	tattaccctc	cgtatctagg	caaattaaat	tcaatctttt	tttttttgcg	3720
utggaaaaggc	aatctttttg	caacggaggg	agtatgggat	gatogatcgg	aggagtttcc	3780
aatgctaaca	cgttgccaaa	ttatttatgt	tagatataat	aatgtttgta	tctcactcac	3840
tgacggagtc	gaacatgtgg	ctggagatat	gtatgagagt	ataccactg	gagatgcggt	3900
tctcttgcag	gtatatatga	gtacggggcg	atacatatgt	ggcattgtta	tagctatttta	3960
cgtatactcc	ctccgttccct	aaatatTTTTg	tctttataga	gatttcacca	cggactacat	4020
acgaatcgta	tatagacata	atTTtagaatg	caagtTcctt	cgctttgctc	cgtatgtagt	4080
ccgtagttaa	aaaattttaa	agacaaatat	ttaggaacgg	aggaagtaga	agatagctag	4140
actgggtgga	gatattatat	atgagtgcct	agaactttttg	agatataaatt	ttgttttcatt	4200
cacctcaaaa	ataaaaaacag	atacaaaaaca	gtattacacc	ccacatctg	catactcgta	4260
tcttaaaagt	gtcacatcca	acggttataa	aagatgaatg	agacgtaact	aaactcgta	4320
gatgtgctat	atcaaaattg	atattatata	atatagtata	ttgatttctt	tgaacaccaa	4380
attattataa	attcatattc	tcaccatatt	gatgcattgat	gtgcattgcag	tggatcacgc	4440
ttatgcttaa	cgaacgacgag	ttcgtcaaaa	tactaagcaa	ctgccacaac	gctctcccaa	4500
aagacgggaa	ggtgatcgtc	gtggatggta	tcctcccggga	gaaccacagac	tcgtctctca	4560
cagcgcgggga	tgcatcacc	ttggatatca	tcatgtttgt	gctcttcaag	ggagcaaagc	4620
agaggacgga	gaaggagttt	gccaggctag	ccaaacaagc	tggatttacc	ggtggcatca	4680
agaaaacctta	catattcttc	aacttttacg	ctcttgagtt	caccaagtag	catccacgta	4740
ccagagtgggt	atagtcccga	ataggagcac	ttcttttttt	gcgaataatg	tcccgaataa	4800
gagctgctag	ctcacgtgct	catttatgat	tttcatttta	ttatttctat	cataaaagcc	4860
atggaccgca	taatgtcctt	aataagcttc	tttgttcaat	aagcctcctg	gtagagtgt	4920
tgtccggttg	ttgtgtcctt	gccttggggc	aaccctagga	tttgggactg	gaggtaggta	4980
gcggcaggac	aatgaagaa	agagaaagac	agaactattt	catttctttt	cgtttttttg	5040
gtgctagacg	gctacaggtg	ttgagcttat	atactgctca	ctcacacagc	acgcgctaca	5100
catactctcg	gcctgctgac	aagatttggc	tctacactca	gattaaaatt	taaccacctt	5160
tgcttaccgt	gatctcacac	gcgcgcctgc	tctgttctgt	atcttctgac	agaggagggg	5220
cgatgcagct	gccccatc					5238

//



XP-002124701

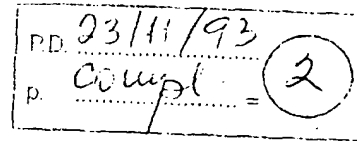


ID ELIB_PHYCR STANDARD; PRT; 118 AA.
AC P15570;
DT 01-APR-1990 (Rel. 14, Created)
DT 01-OCT-1996 (Rel. 34, Last sequence update)
DT 15-JUL-1999 (Rel. 38, Last annotation update)
DE BETA-ELICITIN CRYPTOGEIN PRECURSOR (CKY).
OS Phytophthora cryptogea.
OC Eukaryota, stramenopiles; Oomycetes; Peronosporales; Pythiaceae;
OC Phytophthora.
RN [1]
RP SEQUENCE FROM N.A.
RC STRAIN=ISOLATE 52;
RA PANABIERES F., MARAIS A., LE BERRE J., PENOT I., FOURNIER D.,
RA RICCI P.;
RL Submitted (JUN-1994) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RN [2]
RP SEQUENCE OF 21-118.
RC STRAIN=ISOLATE 52;
RX MEDLINE; 89377822.
RA RICCI P., BONNET P., HUET J.-C., SALLANTIN M., BEAUVAIS-CANTE F.,
RA BRUNETAU M., BILLARD V., MICHEL G., PERNOLLET J.-C.;
RT "Structure and activity of proteins from pathogenic fungi
RT Phytophthora eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco.";
RL Eur. J. Biochem. 183:555-563(1989).
RN [3]
RP X-RAY CRYSTALLOGRAPHY (2.2 ANGSTROMS).
RX MEDLINE; 97148337.
RA BOISSY G., DE LA FORTELLE E., KAHN R., HUET J.-C., BRICOGNE G.,
RA PERNOLLET J.-C., BRUNIE S.;
RT "Crystal structure of a fungal elicitor secreted by Phytophthora
RT cryptogea, a member of a novel class of plant necrotic proteins.";
RL Structure 4:1429-1439(1996).
RN [4]
RP STRUCTURE BY NMR.
RX MEDLINE; 98046740.
RA FEFEU S., BOUAZIZ S., HUET J.-C., PERNOLLET J.-C., GUITTET E.;
RT "Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta
RT elicitor secreted by a phytopathogenic fungus Phytophthora
RT cryptogea.";
RL Protein Sci. 6:2279-2284(1997).
CC -!- FUNCTION: INDUCES LOCAL AND DISTAL DEFENSE RESPONSES (INCOMPATIBLE
CC HYPERSENSITIVE REACTION) IN PLANTS FROM THE SOLANACEAE AND
CC CRUCIFERAE FAMILIES. ELICIT LEAF NECROSIS AND CAUSE THE
CC ACCUMULATION OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS. MIGHT INTERACT WITH
CC THE LIPIDIC MOLECULES OF THE PLASMA MEMBRANE.
CC -!- SUBCELLULAR LOCATION: SECRETED.
CC -!- SIMILARITY: BELONGS TO THE ELICITIN FAMILY.
CC
CC This SWISS-PROT entry is copyright. It is produced through a collaboration
CC between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL outstation -
CC the European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its
CC use by non-profit institutions as long as its content is in no way
CC modified and this statement is not removed. Usage by and for commercial
CC entities requires a license agreement (See <http://www.isb-sib.ch/announce/>
CC or send an email to license@isb-sib.ch).
CC
DR EMBL; Z34459; CAA84224.1; ..
DR PIR; S05526; S05526.
DR PDB; 1BEO; 15-MAY-97.
DR PDB; 1BEG; 03-DEC-97.
DR PFAM; PF00964; Elicitin; 1.
KW Signal; Multigene family; 3D-structure.
FT SIGNAL 1 20
FT CHAIN 21 118 BETA-ELICITIN CRYPTOGEIN.
FT DISULFID 23 91

FT DISULFID 47 76
FT DISULFID 71 115
SQ SEQUENCE 118 AA; 12193 MW; F23ECB12 CRC32;
MNFTALLAAV AAALVGSANA TACTATQQTAYKTLVSILSDASFNQCSTD SGYSMLTAKA
LP7TAQYKLM CASTACNTMI KKIVTLNPPN CDLTVPTSGL VLVVYSYANG FSNKCSSL
//

XP-002124695

ID NTDIMET standard; RNA; PLN; 1471 BP.
 XX
 AC X71430;
 XX
 SV X71430.1
 XX
 DT 23-NOV-1993 (Rel. 37, Created)
 DT 23-NOV-1993 (Rel. 37, Last updated, Version 2)
 XX
 DE N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase
 XX
 KW catechol methyltransferase; SAM dependent enzyme.
 XX
 OS Nicotiana tabacum (common tobacco)
 OC Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 OC euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons;
 OC core eudicots; Asteridae; euasterids I; Solanales; Solanaceae; Nicotiana.
 XX
 RN [1]
 RP 1-1471
 RA Pellegrini L.;
 RT ;
 RL Submitted (15-APR-1993) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
 RL L. Pellegrini, Inst de Biologie Molculaire des Plantes, 12, rue du General
 RL Zimmer, 67084 Strasbourg, FRANCE
 XX
 RN [2]
 RX MEDLINE; 94302149.
 RA Pellegrini L., Geoffroy P., Fritig B., Legrand M.;
 RT "Molecular cloning and expression of a new class of
 RT ortho-diphenol-O-methyltransferase induced by infection or elicitor
 RT treatment of tobacco leaves";
 RL Plant Physiol. 103:509-517(1993).
 XX
 DR SPTREMBL; Q42949; Q42949.
 XX
 FH Key Location/Qualifiers
 FH
 FT SOURCE <1..>1471
 FT /db_xref="taxon:4097"
 FT /organism="Nicotiana tabacum"
 FT /strain="Samsun NN"
 FT /dev_stage="30 day old"
 FT /tissue_type="leaves"
 FT /clone_lib="cDNA from tobacco leaves 72hrs after infection
 FT by TMV in L Zap vector"
 FT /clone="OMT 3.4"
 FT CDS 86..1183
 FT /db_xref="SPTREMBL:Q42949"
 FT /note="class II"
 FT /gene="OMT"
 FT /EC_number="2.1.1.6"
 FT /product="catechol O-methyltransferase"
 FT /protein_id="CAA50561.1"
 FT /translation="MESSTKSQIPTQSEERNCITYAMQLSSSVLPFVLHSTIQLEVFE
 FT ILAKSNDTKLSASQIVSQIPNCKNPDAATMLDRMLYVLASYSLFTCSIVEDENGGQK
 FT RVYGLSQVGKFFVRDEGDGSMGPLLALLQDKVFINSWFELKDAVLEGGVPFDRVHGVVH
 FT AFEYPKSDPKFNDVFNKAMINHTTVVMKKILENYKGFENLKTLDVVGGLGVNLKMIT
 FT KYPTIKGTNFDLPHVVQHAPSYPGVEHVGDMFESVPEGDAIFMKWILHDWSDSHNLKL
 FT LKNCYKALPDNGKVIIVVEAILPVKPDIDTAVVGVSQCDLIMMAQNPGGKERSEEEFRAL
 FT ATEAGFKGVNLICCVCFWVMEFCK"
 XX
 SQ Sequence 1471 BP; 455 A; 249 C; 300 G; 467 T; 0 other;
 aacaaaaaca ctctaaaagg aaaagactac gagaataatt acactacaac tcttatagct 60
 aattctgtgc tcaagatttt cagctatgga atcctcaacc aaaagccaaa taccaacaca 120



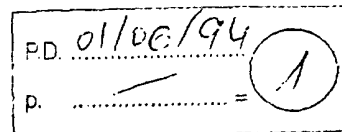
atcagaagaa	gagcgtaact	gcacatatgc	catgcaacta	ttgtcatctt	cagtcctccc	180
ctttgtgttg	cattcaacaa	ttcaattgga	agtttttgag	atattagcca	aatctaataga	240
cactaaactt	tctgcttctc	aaattgtttc	tcaaatccct	aactgcaaga	atcctgatgc	300
agctactatg	ttagatagga	tgctttatgt	cttggctagt	tactcgttgt	ttacttgttc	360
cattgttgag	gatgaagaa	ataatggggg	ccagaaaaga	gtgtatgggt	tgtcacaagt	420
gggaaaattc	tttgtttagag	atgaagatgg	tgcaaccaatg	gggccacttt	tggttttgct	480
tcaagataaa	gtattcataa	acagctgggt	tgaactaaaa	gatgcagttc	ttgaaggagg	540
agttccatlt	gacagggtac	acggtgttgt	gcatgcattt	gaatatocaa	aatcggaccc	600
aaaattcaat	gatgttttca	acaaggcaat	gatcaatcac	acaactgtag	tcatgaaaaa	660
aatacttgaa	aattacaaaag	gttttgagaa	ccttaaaact	ttggttgatg	ttgcagggtg	720
tcttgaggtt	aacctcaaga	tgattacatc	taaatacccc	acaattaagg	gcactaattt	780
tgatttgcca	catgttggtc	aacatgcccc	ttcctatcct	ggggtggaac	atgttggggg	840
agatatgttt	gaaagtgttc	cagaaggaga	tgctatTTTT	atgaagtgga	ttcttcatga	900
ctggagtgat	agtcacaacc	tcaagttgct	aaagaactgc	tacaaggctc	taccagacaa	960
tggaaagggtg	attgtttgtg	aggccatttt	accagtgaaa	ccagacattg	acaccgcagt	1020
ggttggcggtt	tgcgaatgtg	atttgatcat	gatggctcaa	aatcctggag	gcaaagagcg	1080
atcggaagag	gagtttcgag	ccttggctac	tgaagctgga	ttcaaaggcg	ttacttaaat	1140
atgttgtgtc	tgtaattttt	gggtcatgga	attctgcaag	tagatttcta	ctgtacattg	1200
agtttctact	actcttgagt	atccatttat	ggcaatctgg	gactggaatt	gcagcttagt	1260
ccagattgaa	cattgatatt	cctaataata	tttctattat	ttcccttggt	tatttctctt	1320
gtatgaaagg	atgtcatttt	gagtattgat	aatcatgttc	tctaggacag	aaattgtaac	1380
tttgtccaac	tttattgata	ttcctagtaa	gatttatatg	acatgtgtct	ctggtttgag	1440
aagagtttca	atatctaaaa	aaaaaaaaaa	a			1471

//

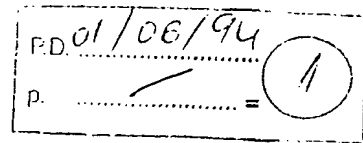
XP-002124702

ID ELIA_PHYME STANDARD; PRT; 98 AA.
AC P35698;
DT 01-JUN-1994 (Rel. 29, Created)
DT 01-JUN-1994 (Rel. 29, Last sequence update)
DT 01-NOV-1995 (Rel. 32, Last annotation update)
DE ALPHA-ELICITIN MGM-ALPHA.
OS Phytophthora megasperma (Potato pink rot fungus).
OC Eukaryota; stramenopiles; Oomycetes; Peronosporales; Pythiaceae;
OC Phytophthora.
RN [1]
RP SEQUENCE.
RX MEDLINE; 93319720.
RA HUET J.-C., PERNOLLET J.-C.;
RT "Sequences of acidic and basic elicitin isoforms secreted by
RT Phytophthora megasperma megasperma.";
RL Phytochemistry 33:797-805(1993).
CC -!- FUNCTION: INDUCES LOCAL AND DISTAL DEFENSE RESPONSES (INCOMPATIBLE
CC HYPERSENSITIVE REACTION) IN PLANTS FROM THE SOLANACEAE AND
CC CRUCIFERAE FAMILIES. ELICIT LEAF NECROSIS AND CAUSE THE
CC ACCUMULATION OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS. MIGHT INTERACT WITH
CC THE LIPIDIC MOLECULES OF THE PLASMA MEMBRANE.
CC -!- SUBCELLULAR LOCATION: SECRETED.
CC -!- SIMILARITY: BELONGS TO THE ELICITIN FAMILY.
DR HSSP; P15570; 1REQ.
DR PFAM; PF00964; Elicitin; 1.
FT DISULFID 3 71 BY SIMILARITY.
FT DISULFID 27 56 BY SIMILARITY.
FT DISULFID 51 95 BY SIMILARITY.
SQ SEQUENCE 98 AA; 10239 MW; C92ACEB8 CRC32;
TTCTSTQQTAAAYVTLVSILSDSSFNQCATD SGYSMLTATA LPTTAQYKLM CASTACNTMI
NKIVTLNPPD CELTVPTSGL VLVVSYANG FSATCASL

//



XP-002124703 ;



ID ELIB_PHYME STANDARD; PRT; 98 AA.
AC P35699;
DT 01-JUN-1994 (Rel. 29, Created)
DT 01-JUN-1994 (Rel. 29, Last sequence update)
DT 01-NOV-1995 (Rel. 32, Last annotation update)
DE BETA-ELICITIN MGM-BETA.
OS Phytophthora megasperma (Potato pink rot fungus).
OC Eukaryota; stramenopiles; Oomycetes; Peronosporales; Pythiaceae;
OC Phytophthora.
RN [1]
RP SEQUENCE.
RX MEDLINE; 93319720.
RA HUET J.-C., PERNOLLET J.-C.;
RT "Sequences of acidic and basic elicitin isoforms secreted by
RT Phytophthora megasperma megasperma.";
RL Phytochemistry 33:797-805(1993).
CC -!- FUNCTION: INDUCES LOCAL AND DISTAL DEFENSE RESPONSES (INCOMPATIBLE
CC HYPERSENSITIVE REACTION) IN PLANTS FROM THE SOLANACEAE AND
CC CRUCIFERAE FAMILIES. ELICIT LEAF NECROSIS AND CAUSE THE
CC ACCUMULATION OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS. MIGHT INTERACT WITH
CC THE LIPIDIC MOLECULES OF THE PLASMA MEMBRANE.
CC -!- SUBCELLULAR LOCATION: SECRETED.
CC -!- SIMILARITY: BELONGS TO THE ELICITIN FAMILY.
DR HSSP; P15570; 1BEQ.
DR PFAM; PF00964; Elicitin; 1.
FT DISULFID 3 71 BY SIMILARITY.
FT DISULFID 27 56 BY SIMILARITY.
FT DISULFID 51 95 BY SIMILARITY.
SQ SEQUENCE 98 AA; 10379 MW; B71542B7 CRC32;
TACTTTQQTAYKTLVSILS ESSFNQCSKD SGYSMLTATA LPTNAQYKLM CASTACKSMI
NKIVVLNPPD CDLTVPTSGL VLDVYTYANG FSTKCASL

//

ID AB023482 standard; DNA; PLN; 156054 BP.

XX

AC AB023482;

XX

SV AB023482.2

XX

DT 15-MAR-1999 (Rel. 59, Created)

DT 03-DEC-1999 (Rel. 61, Last updated, Version 5)

XX

DE Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03.

XX

KW HTG.

XX

OS Oryza sativa

OC Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;

OC euphyllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae;

OC Oryza.

XX

RN [1]

RP 1-156054

RA Sasaki T., Nagamura Y., Yamamoto K.;

RT ;

RL Submitted (05-FEB-1999) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

RL Takuji Sasaki, National Institute of Agrobiological Resources, Rice Genome

RL Research Program; Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

RL (E-mail:tsasaki@abr.affrc.go.jp, Tel:+81-298-38-7441, Fax:+81-298-38-7468)

XX

RN [2]

RP 1-156054

RA Sasaki T., Nagamura Y., Yamamoto K.;

RT "Oryza sativa nipponbare(GA3) genomic DNA, chromosome 6, PAC

RT clone:P0680A03";

RL Unpublished.

XX

gttaatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat	44340
atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat	44400
atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat	44460
atatatatat atatatatat atatagattt attaacatca atagcctaac ataagaatac	44520

P.D. 15/03/1999	1
P.	

XP-002124700

ID PCX24CRY standard; DNA; PLN; 357 BP.

XX

AC Z34459;

XX

SV Z34459.1

XX

DT 01-DEC-1994 (Rel. 42, Created)

DT 19-SEP-1996 (Rel. 49, Last updated, Version 11)

XX

DE P.cryptogea X24 gene for cryptogein

XX

KW cryptogein; X24 gene.

XX

OS Phytophthora cryptogea

OC Eukaryota; stramenopiles; Oomycetes; Peronosporales; Pythiaceae;

OC Phytophthora.

XX

RN [2]

RP 1-357

RA Panabieres F.;

RT ;

RL Submitted (10-JUN-1994) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.

RL Franck Panabieres, Sration de Pathologie vegetale, Institut, National de la

RL Recherche Agronomique, Villa Thuret- 62 boulevard, du Cap, Antibes, 06606

RL Cedex, France

XX

RN [4]

RP 1-357

RA Panabieres F., Marais A., Le Berre J.Y., Penot I., Fournier D., Ricci P.;

RT "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes

RT for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in

RT tobacco";

RL Mol. Plant Microbe Interact. 8:996-1003(1995).

XX

DR SWISS-PROT; P15570; ELIB_PHYCR.

XX

FH Key Location/Qualifiers

FH

FT source 1..357

FT /db_xref="taxon:4786"

FT /organism="Phytophthora cryptogea"

FT /clone="clone X24"

FT /isolate="isolate 52"

FT CDS 1..357

FT /db_xref="SWISS-PROT:P15570"

FT /gene="X24"

FT /product="cryptogein"

FT /protein_id="CAA84224.1"

FT /translation="MNFTALLAAVAAALVGSANATACTATQQTAAAYKTLVLSILSDASFN

FT QCSTDSGYSMILTAKALPTTAQYKLMCASTACNTMIKKIVTLNPNCDLTVPTSGLVNLV

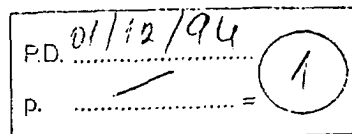
FT YSYANGFSNKCSSL"

XX

SQ Sequence 357 BP; 71 A; 130 C; 93 G; 63 T; 0 other;

```
atgaacttca ccgctctgct cgctgcgctc gccgcgcct tggtcggatc tgccaacgcc      60
accgcgtgca ccgccacca ccagaccgct gcgtacaaga cgctcgtgag catcttgctg      120
gacgcgtcgt tcaaccagtg ctccacggat tggggctact ccatgctgac ggccaaggcc      180
ctccccacca cggcgcagta caagctcatg tgcgcgtcca cggcatgcaa caccatgatc      240
aagaagatcg tgacgctgaa cccgcccacac tgcgacctga cggtgccacac gagcggcctg      300
gtactcaacg tgtactcgta cgcgaacggc ttctcgaaca agtgctcgtc gctgtaa      357
```

//



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00714

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9636697 A	21-11-1996	US 5981843 A	09-11-1999
		AU 5732196 A	29-11-1996
		BG 102047 A	30-11-1998
		BR 9602338 A	13-01-1998
		CA 2221348 A	21-11-1996
		CN 1191565 A	26-08-1998
		CZ 9703656 A	17-06-1998
		EP 0828822 A	18-03-1998
		ES 2134170 A	16-09-1999
		HU 9802383 A	28-01-1999
		JP 11505423 T	21-05-1999
		PL 323383 A	30-03-1998
		ZA 9603957 A	25-11-1996
WO 9503690 A	09-02-1995	AU 7518994 A	28-02-1995
		CA 2168430 A	09-02-1995
		EP 0712273 A	22-05-1996
		JP 9503652 T	15-04-1997
		SG 46678 A	20-02-1998
		US 5670349 A	23-09-1997
		US 5689056 A	18-11-1997
		ZA 9405745 A	14-03-1995
WO 9909188 A	25-02-1999	AU 9072298 A	08-03-1999
WO 9305160 A	18-03-1993	AU 663726 B	19-10-1995
		AU 2516792 A	05-04-1993
		BR 9206481 A	31-10-1995
		EP 0603250 A	29-06-1994
		JP 6510429 T	24-11-1994
WO 9115585 A	17-10-1991	NL 9000773 A	01-11-1991
		AT 174931 T	15-01-1999
		AU 642252 B	14-10-1993
		AU 7684591 A	30-10-1991
		CA 2056439 A	03-10-1991
		DE 69130660 D	04-02-1999
		DE 69130660 T	17-06-1999
		EP 0474857 A	18-03-1992
		EP 0874055 A	28-10-1998
		ES 2128318 T	16-05-1999
		GR 3029461 T	28-05-1999
		JP 5505110 T	05-08-1993
		PT 97230 A,B	31-12-1991
		US 5866776 A	02-02-1999



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : International No

PCT/FR 00/00714

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00 A01N63/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CAPELLADES M ET AL: "THE MAIZE CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTER IS ACTIVE IN TRANSGENIC TOBACCO AND MAIZE PLANT TISSUES" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412	1-11, 14, 15, 24-32
Y	le document en entier --- -/--	12, 13, 16-20



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/07/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No
PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>PELLEGRINI, LUCA ET AL: "Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O- methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment" PLANT PHYSIOL. (1993), 103(2), 509-17, XP002124694 le document en entier</p> <p>-& PELLEGRINI, L.: "N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase" EMBL ACCESSION NO:X71430, 23 novembre 1993 (1993-11-23), XP002124695 le document en entier</p>	12,13
X	<p>WO 96 36697 A (UNIV PENNSYLVANIA) 21 novembre 1996 (1996-11-21)</p>	21,22, 24-32
Y	<p>exemple 15</p>	16-20,23
X	<p>KELLER, HARALD ET AL: "Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance" PLANT CELL (1999), 11(2), 223-235, février 1999 (1999-02), XP002124696</p>	21,22, 24-32
Y	<p>le document en entier</p>	16-20,23
Y	<p>WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 février 1995 (1995-02-09) tableau 3</p>	23
X	<p>WO 99 09188 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ;BOERJAN WOUT (BE); CHEN CUIYING (BE) 25 février 1999 (1999-02-25)</p>	1-11, 14-16, 24-32
Y	<p>page 6 -page 9 page 17, ligne 5 - ligne 10</p>	17-20
X	<p>WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 mars 1993 (1993-03-18)</p>	1-11, 14-16, 24-32
	<p>page 11, ligne 11 - ligne 24; figure 4</p>	
X	<p>GRIMMIG, BERNHARD ET AL: "Structure of the parsley caffeoyl -CoA O- methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element" PLANT MOL. BIOL. (1997), 33(2), 323-341, XP002054325 le document en entier</p>	1-11, 14-16, 24-32
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e Internationale No

PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 23, 8 juin 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, LEE, J. E. ET AL.: "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced 0- methyltransferase from barley (Hordeum vulgare L.)" XP002124705 abrégé -& LEE, J.E., ET AL.: "Hordeum vulgare caffeic acid 0-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds" EMBL ACCESSION NO:U54767, 23 août 1996 (1996-08-23), XP002124698 le document en entier & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363, ---</p>	1-11
X	<p>CHEN, C.: "Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5" EMBL ACCESSION NO:AJ223620, 4 septembre 1998 (1998-09-04), XP002124699 le document en entier ---</p>	1
X	<p>SASAKI, T., ET AL.: "Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03" EMBL ACCESSION NO: AB023482, 15 mars 1999 (1999-03-15), XP002141362 see reverse complement of nts 44350-44495 ---</p>	12
A	<p>PANABIERES, F.: "P.cryptogea X24 gene for cryptogein" EMBL ACCESSION NO:Z34459, 1 décembre 1994 (1994-12-01), XP002124700 le document en entier & PANABIERESS, F., ET AL.: "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitins, protein inducing a hypersensitive-like response in tobacco" MOL PLANT MICROBE INTERACT., vol. 8, 1995, pages 996-1003, -& PANABIERES, F.: "Beta-elcitin cryptogein precursor" SWISSPROT ACCESSION NO:P15570, 1 avril 1990 (1990-04-01), XP002124701 le document en entier ---</p>	18-20
A	<p>HUET, J.C., ET AL.: "Alpha-elicitin MGM-alpha" SWISSPROT ACCESSION NO:P35698, 1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124702 le document en entier ---</p>	19,20

-/-



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUET, J.C., ET AL.: "Beta-elicitin MGM-beta" SWISSPROT ACCESSION NO:P35699, 1 June 1994 (1994-06-01), XP002124703 the whole document	19,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 March 1994 (1994-03-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 129730, KAUFFMANN, S. ET AL: "Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco." XP002124706 abstract & DEV. PLANT PATHOL. (1993), 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), 140-3,	18-20
A	BAILLIEUL, F., ET AL.: "A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance" THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 4, 1995, pages 551-560, XP002124704 page 552, right-hand column	18-20
A	WO 91 15585 A (RIJKSLANDBOUWHOGESCHOOL) 17 October 1991 (1991-10-17) the whole document	1-32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Don. a Internationale No

PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUET, J.C., ET AL.: "Beta-elicitin MGM-beta" SWISSPROT ACCESSION NO:P35699, 1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124703 le document en entier	19,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 mars 1994 (1994-03-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 129730, KAUFFMANN, S. ET AL: "Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco." XP002124706 abrégé & DEV. PLANT PATHOL. (1993), 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), 140-3,	18-20
A	BAILLIEUL, F., ET AL.: "A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance" THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 4, 1995, pages 551-560, XP002124704 page 552, colonne de droite	18-20
A	WO 91 15585 A (RIJKSLANDBOUWHOGESCHOOL) 17 octobre 1991 (1991-10-17) le document en entier	1-32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den 3 Internationale No

PCT/FR 00/00714

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9636697 A	21-11-1996	US 5981843 A	09-11-1999
		AU 5732196 A	29-11-1996
		BG 102047 A	30-11-1998
		BR 9602338 A	13-01-1998
		CA 2221348 A	21-11-1996
		CN 1191565 A	26-08-1998
		CZ 9703656 A	17-06-1998
		EP 0828822 A	18-03-1998
		ES 2134170 A	16-09-1999
		HU 9802383 A	28-01-1999
		JP 11505423 T	21-05-1999
		PL 323383 A	30-03-1998
		ZA 9603957 A	25-11-1996
WO 9503690 A	09-02-1995	AU 7518994 A	28-02-1995
		CA 2168430 A	09-02-1995
		EP 0712273 A	22-05-1996
		JP 9503652 T	15-04-1997
		SG 46678 A	20-02-1998
		US 5670349 A	23-09-1997
		US 5689056 A	18-11-1997
		ZA 9405745 A	14-03-1995
WO 9909188 A	25-02-1999	AU 9072298 A	08-03-1999
WO 9305160 A	18-03-1993	AU 663726 B	19-10-1995
		AU 2516792 A	05-04-1993
		BR 9206481 A	31-10-1995
		EP 0603250 A	29-06-1994
		JP 6510429 T	24-11-1994
WO 9115585 A	17-10-1991	NL 9000773 A	01-11-1991
		AT 174931 T	15-01-1999
		AU 642252 B	14-10-1993
		AU 7684591 A	30-10-1991
		CA 2056439 A	03-10-1991
		DE 69130660 D	04-02-1999
		DE 69130660 T	17-06-1999
		EP 0474857 A	18-03-1992
		EP 0874055 A	28-10-1998
		ES 2128318 T	16-05-1999
		GR 3029461 T	28-05-1999
		JP 5505110 T	05-08-1993
		PT 97230 A,B	31-12-1991
		US 5866776 A	02-02-1999

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

La présente invention concerne une nouvelle séquence de régulation promotrice inductible en réponse à une blessure, mécanique ou chimique, ou en réponse à une agression par un agent pathogène, notamment bactérien, fongique ou viral, ou par un insecte ou un nématode.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant la séquence de régulation promotrice selon l'invention qui contrôle l'expression d'une séquence codante hétérologue, hétérologue signifiant ici une séquence codante différente de la séquence codante native.

La présente invention concerne également un organisme hôte comprenant ledit gène chimère, les plantes transformées le comprenant et les semences (graines) desdites plantes transformées.

Il est connu de l'état de la technique que certains gènes, silencieux en l'absence d'agression, ne sont activés que par une agression tant mécanique que chimique et/ou en réponse à une agression par un agent pathogène, un insecte ou un nématode. De tels gènes et leurs facteurs d'activation sont notamment décrits dans le brevet US 5 670 349.

Ces différents modes de défense sont généralement liés à une régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de défense des plantes par induction de leurs séquences de régulation promotrices. On connaît plusieurs séquences de régulation inductibles comme les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB, tous ces promoteurs étant rappelés avec les références des publications correspondantes par le Tableau 3 du brevet US 5 670 349. On connaît également le promoteur HMG2 décrit dans ce même brevet US 5 670 349, comme le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'amino cyclopropane carboxylate syntase (ACC synthase) de pomme décrits dans la demande de brevet WO 98/45445.

La présente invention concerne un nouveau fragment d'acide nucléique, en particulier isolé, comprenant un promoteur de plante (ou séquence de régulation promotrice) inductible, ledit promoteur inductible étant constitué par le promoteur d'un

gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (ci-après COMT II) de plante.

Les gènes d'*O*-méthyltransférase de classe II, dont le gène d'acide caféique-*O*-méthyltransférase de classe II, de plantes sont silencieux (inactifs) en l'absence de toute agression puisque les plantes non agressées ne l'expriment pas, ou pour le moins à des
5 niveaux indétectables par les méthodes d'analyse usuelles. Ainsi, le messenger de la COMT II est indétectable par la technique de " Northern blot " dans différents tissus d'une plante saine non traitée, comme par exemple le tabac (Pellegrini & al., 1993). Cette COMTII et son promoteur sont activés (ou induits) par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, ou aux agressions chimiques par différents
10 produits comme le benzothiazole (BTH), le méthyle jasmonate ou des éliciteurs d'origine végétale comme la pectine.

De manière avantageuse, le fragment d'acide nucléique isolé selon l'invention est constitué par un promoteur de COMTII de plante.

Par COMTII de plante, on entend selon l'invention toute OMT de plante qui n'est
15 pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui l'est à la suite d'une agression mécanique, chimique, par un pathogène, un insecte ou un nématode.

Par plante d'origine de la COMTII, on entend selon l'invention tout organisme pluricellulaire différencié capable de photosynthèse, qu'elle soit monocotylédone ou dicotylédone, comme par exemple le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le
20 colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la COMT II est une COMT de plante dicotylédone, de préférence de tabac.

Par promoteur, on entend selon l'invention la région non codante d'un gène impliqué dans la liaison avec l'ARN polymérase et d'autres facteurs qui sont
25 responsables de l'initiation et de la modulation de la transcription conduisant à la production d'un transcrit d'ARN. Il s'agit plus particulièrement de toute séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon " start " (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.

Le promoteur selon l'invention comprend avantageusement une séquence de plus
30 de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMT II, de préférence de plus de 700, de plus de 800 voire de plus de 900 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, encore plus

préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG. Les promoteurs comprenant plus de 1500 nucléotides en amont de l'ATG de la COMTII font également partie de la présente invention.

Le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription. Le site d'initiation
5 de la transcription est généralement situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

De manière avantageuse, l'extrémité 3' du promoteur COMTII selon l'invention est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG. De préférence, l'extrémité 3' du promoteur COMTII est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site
10 d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

Le promoteur COMTII selon l'invention comprend également au moins une boîte TATA et au moins une boîte CAT. La boîte TATA est généralement située à moins de 50 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, à environ 40 nucléotides
15 en amont. La boîte CAT est généralement située à moins de 100 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription, de préférence à environ 100 nucléotides et/ou 80 nucléotides en amont. De manière avantageuse, le promoteur comprend deux boîtes CAT.

Le promoteur selon l'invention comprend également des éléments régulateurs
20 impliqués dans l'expression de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes et des gènes associés à la défense, en particulier au moins une boîte A et/ou au moins une boîte L et/ou au moins une boîte L inversée et/ou au moins une boîte P et/ou au moins une boîte W inversée. La boîte A comprend la séquence suivante CCGTCC. Elle est généralement située à moins de 410 nucléotides du site d'initiation de la transcription.
25 La boîte L comprend la séquence suivante CTTCAACAACCAACC. Elle est généralement située à moins de 180 nucléotides du site d'initiation de la transcription. La première boîte L inversée comprend la séquence suivante GTTAGGTGAAG. Elle est généralement située à moins de 1000 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes L
30 inversées, l'une à environ 970 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et l'autre à environ 440 nucléotides en amont. La deuxième boîte L inversée comprend la séquence suivante TGTTAGGTGTGTGTTT. La boîte P

comprend la séquence suivante CACACCAACTCCCA. Elle est généralement située à moins de 750 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte W inversée comprend la séquence suivante GGTCAG. Elle est généralement située à moins de 1200 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription.

- 5 Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes W inversées, l'une à environ 1110 nucléotides en amont et l'autre à environ 210 nucléotides en amont.

- Le promoteur selon l'invention comprend également au moins une boîte E et/ou au moins une boîte G et/ou au moins une boîte GT. La boîte E comprend la séquence
- 10 suivante TTCCATCAAG. Elle est généralement située à moins de 110 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte G comprend la séquence suivante CCACGT. Elle est généralement située à moins de 600 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. La boîte GT comprend la séquence suivante GGTTAA. Elle est généralement située à moins de 450 nucléotides en amont du site d'initiation de
- 15 la transcription. Avantageusement, le promoteur selon l'invention comprend deux boîtes GT, l'une à environ 400 nucléotides en amont et l'autre à environ 280 nucléotides en amont.

- Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, le promoteur selon l'invention est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la séquence
- 20 nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1). De préférence le promoteur COMTII de tabac comprend la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1795 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybriser de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues. Préférentiellement le promoteur COMTII de tabac comprend la séquence comprise entre
- 25 les nucléotides 557 et 889 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybriser de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues. Le promoteur inductible COMTII de tabac est activé par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, ou aux agressions chimiques par différents produits comme le benzothiazole (BTH), le méthyle jasmonate ou des éliciteurs d'origine végétale
- 30 comme la pectine. L'étude fonctionnelle du promoteur a permis d'identifier les régions impliquées dans l'induction du promoteur dans différentes conditions. Le fragment comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 698 à 1365 est nécessaire et

suffisant pour conférer la sensibilité et l'induction par blessure, par le VMT, la mégaspermine, la pectine et la chitine. Préférentiellement le promoteur COMTII de tabac comprend donc la séquence comprise entre les nucléotides 698 et 1365 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites

5 séquences et leurs séquences homologues. Ce fragment peut être associé à un autre promoteur pour induire l'expression d'un gène par blessure, par le VMT, la mégaspermine, la pectine ou la chitine. Ce fragment peut ainsi être associé au promoteur minimum du RNA 35S du CaMV. La présente invention a donc également pour objet un promoteur chimère comprenant la séquence comprise entre les nucléotides

10 698 et 1365 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues. L'analyse de la réponse du promoteur vis à vis du méthyl jasmonate et les UV indique que le fragment comprenant la séquence comprise entre les nucléotides 815 et 1795 de la SEQ ID NO 1 est fonctionnel. Dans un mode de réalisation avantageux, le promoteur COMTII de

15 tabac comprend donc la séquence comprise entre les nucléotides 815 et 1795 de la SEQ ID NO 1, les séquences capables de s'hybrider de manière sélective aux dites séquences et leurs séquences homologues.

Par « séquence capable de s'hybrider de manière sélective », on entend selon l'invention les séquences qui s'hybrident avec les séquences ci-dessus à un niveau

20 supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres séquences d'ADN présentes, notamment d'autres ADNc présentes dans une banque d'ADNc. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences définies par les séquences ID ci-dessus selon l'invention est généralement 10 fois, de préférence 100 fois

25 plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la sonde avec des éléments radioactifs, comme le ^{32}P . L'hybridation sélective est généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ 50°C-60°C). L'hybridation peut bien entendu être

30 effectuée selon les méthodes usuelles de l'état de la technique (notamment Sambrook & al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual).

Par séquence homologue, on entend selon l'invention toute séquence comprenant

plus de 70 % d'homologie, préférentiellement plus de 80 % d'homologie, encore plus préférentiellement plus de 90 % d'homologie, et qui conserve les éléments fonctionnels du COMTII lui conférant ses propriétés de promoteur inductible. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul & al., 1993, J. Mol. Evol. 36 :290-300 ; Altschul & al., 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-10).

L'isolement, le clonage et la caractérisation des promoteurs COMT II à partir des gènes de COMT II se fait selon les méthodes expérimentales usuelles de l'homme du métier pour isoler, cloner et caractériser un promoteur, abondamment décrites dans la littérature.

L'isolement et le clonage d'un gène COMT II se fait par analyse d'une banque génomique préparée à partir de l'ADN de la plante d'intérêt. L'ADN génomique est coupée par une ou plusieurs enzymes de restriction appropriées et introduit dans un vecteur adéquat pour constituer, par des méthodes connues de l'homme du métier, une banque contenant l'ensemble du DNA génomique de la plante (Ausubel et al., 1998; Sambrook et al., 1989).

Le ou les clones renfermant un gène COMT II est (sont) isolé(s) grâce à une sonde nucléotidique. La séquence de la sonde est soit déduite de la séquence protéique si l'enzyme a été purifiée (en suivant son activité, par exemple), soit préparée à partir d'un clone de cDNA issu d'une banque. Cette banque de cDNA est préparée à partir de mRNA extrait de tissus traités de façon à induire l'expression du gène COMT II (par la blessure, l'infection ou un traitement chimique comme décrit dans les exemples ou les figures 1-5). La banque de cDNA est ensuite criblée par des anticorps dirigés contre une protéine COMT II (de tabac par exemple) ou par une sonde nucléotidique déduite de la protéine COMT II de la plante considérée ou déduite des séquences conservées chez les COMT de plantes. Le cDNA ainsi isolé est caractérisé par sa séquence nucléotidique ou par l'activité enzymatique de la protéine recombinante obtenue après expression du cDNA dans un organisme procaryote ou eucaryote.

Les séquences non codantes du cDNA (3' et/ou 5') sont utilisées pour sélectionner, par PCR, en conditions très sélectives, le ou les clones génomiques renfermant le gène COMT II exprimé lors du traitement utilisé pour construire la banque cDNA. Les

séquences promotrices sont alors être isolées par PCR ou toute autre méthode appropriée bien connue de l'homme du métier.

Sur la base des informations contenues dans la présente demande de brevet pour le promoteur COMTII de tabac, l'homme du métier sera à même d'identifier d'autres promoteurs COMTII d'autres espèces végétales une fois le gène COMTII identifié et cloné selon les méthodes usuelles, notamment celles décrites ci-dessus.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', la séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur COMT II selon l'invention défini auparavant.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Comme séquence de régulation en 5', on peut utiliser le promoteur COMTII selon l'invention seul ou associé à au moins une partie d'un promoteur d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose- biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), ou le promoteur du circovirus (AU 689 311).

On peut encore utiliser le promoteur COMTII selon l'invention en association avec au moins une partie d'un promoteur spécifique de régions ou de tissus particuliers



des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines ([22] Datla, R.& al., Biotechnology Ann. Rev. (1997) 3, 269-296), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460) ou de l'oélosine (WO 98/45461).

5 Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec le promoteur COMTII selon l'invention, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (VMT) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (VET)
10 décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

15 La séquence codante du gène chimère selon l'invention comprend une séquence codante pour un gène rapporteur, comme la séquence codante GUS, ou une séquence codante pour une protéine d'intérêt. Au regard du mode d'induction du promoteur selon l'invention, blessure, infection virale ou réponse à des éliciteurs, la protéine d'intérêt est avantageusement une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux
20 maladies ou aux insectes.

Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les
25 peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la
30 drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines

(Kamoun & al., 1993 ; Panabières & al., 1995). De manière préférentielle, le peptide éliciteur fongique est la mégaspermine. La mégaspermine et sa séquence codante est représentée par l'identificateur de séquence n° 13 (SEQ ID 13). De manière plus préférentielle, le gène chimère selon l'invention comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur COMT II et une séquence codante pour la mégaspermine comprend la séquence d'ADN représentée par l'identificateur de séquence n° 14 (SEQ ID 14).

Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photorabdus* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante pour un éliciteur et une séquence de régulation en 3', la séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur inductible.

De manière préférentielle, l'éliciteur est une élicitine, plus préférentiellement la mégaspermine telle que définie ci-dessus.

Le promoteur inductible est avantageusement choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinasés, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB (US 5 670 349, Tableau 3), le promoteur HMG2 (US 5 670 349), le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou le promoteur de l'acétyl cyclopropane carboxylate synthase (ACC synthase) de pomme (WO 98/45445).

La présente invention concerne également un vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de répllication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature. Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui



peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

- 5 Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, le gène chimère selon l'invention peut être employé en association avec un gène marqueur de sélection, soit dans un même vecteur, les deux gènes étant associés de manière convergente, divergente ou colinéaire, ou encore dans deux vecteurs employés simultanément pour la transformation de l'organisme hôte. De tels gènes marqueurs et leur utilisation pour la
- 10 transformation des plantes sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

- Parmi les gènes codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques, les gènes de tolérance aux herbicides (bialaphos, glyphosate ou isoxazoles), des gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement
- 15 identifiabiles comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

- 20 L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des cellules végétales par intégration au génome des dites cellules végétales d'au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon
- 25 l'invention.

- Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri
- 30 d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG. L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de



l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales ou plantes transformés et contenant un gène chimère défini ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus. Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, 5 US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, 10 US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

15 La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes transformées pouvant être obtenues selon l'invention peuvent être du type monocotylédones telles que par exemple les céréales, la canne à sucre, le riz et le 20 maïs ou dicotylédones comme par exemple le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle, etc.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent contenir d'autres gènes d'intérêt, conférant aux plantes de nouvelles propriétés agronomiques. Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer 25 les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une tolérance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128. On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou 30 encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés ([1]; WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ;

WO 94/20828 ; WO 92/14822). Ces protéines enrichies en acides aminés soufrés auront également pour fonction de piéger et stocker la cystéine et/ou la méthionine excédentaire, permettant d'éviter les problèmes éventuels de toxicité liés à une surproduction de ces acides aminés soufrés en les piégeant. On peut citer également des
5 gènes codant pour des peptides riches en acides aminés soufrés et plus particulièrement en cystéines, les dits peptides ayant également une activité antibactérienne et/ou antifongique. On citera plus particulièrement les défensines de plantes, de même que les peptides lytiques de toute origine, et plus particulièrement les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la
10 drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Ces autres gènes d'intérêt peuvent être combinés au gène chimère selon l'invention soit par croisement conventionnel de deux plantes contenant chacune l'un des gènes (la première le gène chimère selon l'invention et la seconde le gène codant pour la protéine d'intérêt) soit en effectuant la transformation de cellules végétales
15 d'une plante contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt avec le gène chimère selon l'invention.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont
20 données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology"
25 Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al ou dans Sambrook et al 1989.

Description de la figure 1 : Cinétiques d'activités GUS (1A) correspondant à la construction promoteur COMTII(-1215 à +24)/GUS et COMTII (1B) au cours d'une infection virale (VMT) ou lors d'une blessure.

Exemple 1 : Isolement du gène COMT de classe II

30 Le criblage d'une banque génomique de tabac a permis d'isoler 6 clones différents contenant des gènes de COMT de classe II (COMTII). Ces derniers ont d'abord été caractérisés par leurs profils de restriction qui ont révélé une certaine hétérogénéité

parmi les différents clones.

Les COMTII forment une famille multigénique composée de six à sept gènes dont un seul est transcrit dans les réactions de défense puisqu'un seul type d'ADNc a été caractérisé dans une banque élaborée à partir de feuilles inoculées par le virus de la mosaïque du tabac (VMT) (Pellegrini & al. 1993). Afin d'identifier le ou les clones renfermant le gène exprimé lors des réactions de défense, des réactions PCR ont été réalisées en utilisant des amorces dérivées de la région 3' non codante de l'ADNc. Dans des conditions de sélectivité élevée un seul clone est alors amplifié. Les produits d'amplifications ont été séquencés. Les séquences obtenues ont présenté une homologie parfaite avec celles des régions 3' non codantes de l'ADNc.

Exemple 2 : Analyse des séquences du promoteur de gène de la COMT de classe II

Le clone génomique retenu a été sous-cloné dans un vecteur bactérien (puc 18) et représente un insert de 14 kb dont 9 kb sont situés en amont de l'ATG du gène COMTII.

Le site d'initiation de la transcription a été déterminé par la technique d'extension d'amorce et il se place à 90 nucléotides du site d'initiation de la traduction.

Le promoteur a été séquencé sur une longueur de 1771 kilobases. Des éléments non spécifiques et communs aux gènes eucaryotes impliqués dans l'initiation de la transcription tels la TATA box et la CAT box ont été retrouvés dans le promoteur COMTII (SEQ ID NO 1). Des sites de régulation ont été mis en évidence par comparaison des séquences promotrices du gène COMTII avec celles de gènes intervenant dans les mécanismes de défense. Le promoteur COMTII contient des éléments spécifiques des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes impliqués dans la réponse au stress comme les trois boîtes P, A, L (initialement identifiées dans le gène PAL de persil) (SEQ ID NO 1). Ces trois boîtes sont impliquées dans la réponse aux éliciteurs et les boîtes P et L sont également impliquées dans la réponse aux UV. La boîte E initialement identifiée dans le gène de la CCoAOMT de persil et extrêmement conservée dans les gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes joue aussi un rôle dans la réponse aux éliciteurs.

Le promoteur COMTII possède également des éléments jouant un rôle important dans l'induction de gènes PR par les éliciteurs telle la boîte W (SEQ ID NO 1).



Des éléments régulateurs généraux sont retrouvés dans le promoteur de la COMTII telles les boîtes G, GT et l'élément activateur du virus simiens SV40 (SEQ ID NO 1). La boîte G est un élément présent dans une grande variété de promoteurs végétaux. La boîte G, associée à des éléments cis spécifiques, est impliquée dans la
5 régulation de nombreux gènes répondant à différents signaux physiologiques et environnementaux. La région promotrice, responsable de la régulation de gènes par le méthyle jasmonate, est constituée d'une boîte G associée à des séquences riches en nucléotides C. Une organisation similaire est retrouvée au niveau du promoteur de gènes
10 spécifiquement induits lors de la blessure. Les boîtes L, présentes dans le promoteur de la COMTII, pourraient intervenir dans ce genre d'interactions car ce sont des motifs riches en nucléotides C.

Les boîtes GT, représentées plusieurs fois dans les promoteurs, semblent jouer un rôle dans la modulation de l'expression de certains gènes végétaux, soit en tant qu'activateur ou en tant que répresseur.

15

Exemple 3 : Analyse fonctionnelle des régions promotrices du gène COMTII

L'analyse fonctionnelle du promoteur COMTII a été réalisée par transgènes en expression stable. Le transgène a été obtenu par fusion transcriptionnelle entre le promoteur et un gène rapporteur, le gène GUS (β -glucuronidase). Quatre constructions
20 correspondant à différentes délétions du promoteur ont été réalisées afin de préciser la nature des séquences promotrices importantes responsables de la régulation du gène. Ces constructions correspondent aux séquences promotrices de -1215 à +24 paires de bases (bp), de -420 à +24 bp, de -313 à +24bp et de -121 à +24 bp (par rapport au site +1 de la transcription), 557 à 1795, 1352 à 1795, 1459 à 1795 et 1651 à 1795
25 respectivement sur la SEQ ID NO 1 introduites en amont du gène GUS dans le vecteur pBi101 (Clontech).

Les différentes constructions ont été introduites via *Agrobacterium tumefaciens* dans le génome des plantes. Une population d'une dizaine de plants de tabac transformés a été régénérée pour chaque construction. Le niveau d'expression du transgène a été
30 déterminé par dosage de l'activité enzymatique et par des tests histochimiques. Parallèlement l'expression des gènes COMTII a été analysée par mesure de l'activité des enzymes correspondantes.

Résultats:

L'activité GUS a été testée dans ces plantes dans différentes conditions d'induction des réactions de défense, par un éliciteur fongique injecté dans les feuilles (mégaspermine), ou après exposition aux UV. Les résultats obtenus sont rapportés dans les Tableaux 1 et 2 ci-dessous. L'activité GUS est exprimée en pmole MU/min. mg. Pour le Tableau 1, le témoin (T) est constitué par l'infiltration d'eau dans les feuilles des plantes transformées. Des plantes contrôles transformées avec un vecteur vide avaient une activité d'environ 10-30 pmoles/min.mg. Pour le Tableau 2, le témoin (T) correspond à l'activité GUS basale dans les plantes non traitées.

Tableau 1 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction par la mégaspermine

Construction COMT II/GUS	Activité GUS	
	T	Mégaspermine
COMT II -1215 à +24	150	1150
COMT II -420 à +24	2	6
COMT II -313 à +24	0,4	0,8
COMT II -121 à +24	0,2	0,8

Tableau 2 - Expression de l'activité GUS correspondant aux différentes constructions COMT II/GUS : induction aux UV

Construction COMT II/GUS	Activité GUS	
	T	UV
COMT II -1215 à +24	90	900
COMT II -420 à +24	10	12
COMT II -313 à +24	10	11
COMT II -121 à +24	11	10

Ces résultats montrent que la taille du promoteur doit être supérieure à 600pb, en l'occurrence 1239 bp pour permettre l'induction et une forte expression du gène GUS. Les délétions du promoteurs correspondant aux constructions (-420 à +24), de (-313 à +24) et de (-121 à +24) provoquent une perte complète de l'expression du gène GUS dans toutes les conditions testées. L'activité du gène GUS sous le contrôle du promoteur de 1239 pb est 1000 fois supérieure à celle observée pour les autres constructions.

Activation du promoteur de la COMTII par la blessure et le méthyle jasmonate et par des éliciteurs d'origine et de nature variées.

Les plantes transgéniques possédant la construction COMTII(- 1215 à +24)/GUS ont été traitées avec différents produits chimiques, régulateurs des réactions de défense, par l'acide salicylique (SA) et le méthyl-2-6-dichloroisonicotinique (INA), par des éliciteurs fongiques comme des glucanes ou des fragments de chitine et un éliciteur d'origine végétale comme la pectine. L'activité GUS a été mesurée dans les feuilles 16h après infiltration de ces composés et les résultats rapportés dans le Tableau 3 ci-dessous. L'activité GUS est exprimée en pmole MU/min.mg. Le témoin (T) correspond à l'activité GUS basale dans les plantes transformées non traitées.

Tableau 3 - Induction de l'activité GUS par des éliciteurs

	Activité GUS	Induction %
T	600	100
H ₂ O	1200	200
SA (1mM)	1200	200
INA (1mM)	1700	200
Chitines (100µg/ml)	1200	200
Glucanes (200µg/ml)	1400	200
Pectines (200µg/ml)	3700	600

L'augmentation la plus forte de l'activité GUS (de l'ordre de 3) est obtenue dans les plantes infiltrées par des fragments pectiques par rapport au contrôle.

L'induction du promoteur de 1239 pb a été étudiée lors de la blessure ou après traitement par le méthyle jasmonate (molécule jouant un rôle dans la signalisation des réponses de défense lors de la blessure) et par le benzothiadiazole (BTH) (inducteur chimique de la SAR). L'activité GUS est mesurée 16h après traitement. Les résultats sont rapportés sur le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 - Induction de l'activité GUS par différents composés et stress

	Induction de l'activité GUS %
T	100
BTH	250



Blessure	600
Méthyle jasmonate	1450
UV	1000

Le témoin (T) correspond à l'activité GUS des plantes non traitées. Le promoteur est activé par les différents traitements.

Les facteurs d'induction varient de 2,5 (BTH) à 14,5 (méthyle jasmonate).

Activation du promoteur de la COMTII lors de l'infection virale.

- 5 L'inoculation du VMT chez le tabac nécessite la production de micro blessures au niveau des feuilles permettant l'entrée du virus et sa multiplication. L'activité GUS et l'activité COMTII ont été mesurées dans les feuilles blessées et dans les feuilles inoculées par le virus. Les résultats (figure 1) montrent que le gène GUS sous le contrôle du promoteur COMTII a une cinétique d'induction identique à celle du gène
- 10 COMTII endogène, suivie par la mesure de l'activité catalytique des protéines correspondantes. Le promoteur COMTII est induit précocement par la blessure et présente un maximum d'activité à 16h. Le même pic d'activité est observé à 16h au cours de l'infection virale et est dû à la blessure des feuilles provoquée par l'inoculation du virus. Dans les feuilles inoculées, l'activité GUS est fortement stimulée à partir du
- 15 3ème jour et progresse jusqu'au 7ème jour. L'induction locale et systémique du promoteur lors de l'infection virale a été mesurée à 3 et 7 jours après l'inoculation du VMT. Les activités GUS exprimées en pmol MU/min.mg, sont rapportées dans le Tableau 5 et représentent une moyenne des valeurs obtenues dans 9 transformants. Le témoin T correspond à l'activité GUS des plantes non traitées.

Tableau 5 - Induction locale et systémique (SAR) de l'activité GUS

	Activité GUS
T	700
Feuilles inoculées après 3 jours	3800
Feuilles inoculées après 7 jours	7100
Feuilles SAR après 7 jours	2700

Ces résultats montrent une induction de 1100% du promoteur à 7 jours dans les
5 feuilles inoculées. L'activité GUS mesurée à 7 jours dans les feuilles SAR est plus faible
mais très significative. Cependant, dans les feuilles non inoculées les facteurs
d'induction calculés à partir des activités GUS sont plus fortes que celles obtenues à
partir des activités COMTII (Tableau 6). Ceci est dû, d'une part au fait que le test
d'activité GUS est plus sensible que celui de la COMTII et, d'autre part au fait que la
10 protéine GUS est extrêmement stable et que l'activité GUS mesurée correspond à une
accumulation de cette protéine après le traitement. La comparaison des activités GUS et
COMTII est rapportée dans le Tableau 6 ci-dessous. Les feuilles non inoculées où se
développe la résistance systémique acquise sont appelées " feuilles SAR ".

Tableau 6 – Facteurs d'induction des activités GUS et COMTII 3 et 7 jours
15 **après inoculation par le VMT dans les feuilles infectées et les feuilles SAR**

	Induction des activités GUS		Induction des activités COMTII	
	Feuilles Inoculées	Feuilles SAR	Feuilles Inoculées	Feuilles SAR
3 jours	5,8	-	5,8	-
7 jours	11	3,9	15	1,8

***Analyse histochimique de l'activité GUS lors d'une infection virale et après
blessure.***

Une analyse histochimique de l'activité GUS dans des feuilles inoculées par le
20 VMT, 7 jours après virose, montre que l'expression du gène GUS est localisée dans les
cellules entourant le site d'infection. Des coupes transversales des feuilles au niveau des
lésions ont été réalisées afin de déterminer les types cellulaires impliqués et, montrent
que l'induction du gène GUS n'est pas tissu spécifique mais concerne toutes les cellules

autour des lésions.

L'analyse histochimique de l'expression du gène GUS dans des feuilles blessées, 2 jours après traitement, montre une induction du gène GUS dans les tissus non blessés entourant les sites de blessure par piqûres ou à l'aide de forceps. Ces résultats impliquent
5 qu'un signal est émis à partir des tissus blessés vers les tissus intacts induisant une expression systémique du gène GUS. Le méthyle jasmonate synthétisé dans les tissus blessés pourrait induire à distance le gène GUS, car une application exogène de méthyle jasmonate induit une activité GUS. Le test histochimique réalisé sur des feuilles issues de plantes transgéniques 35S/GUS est le contrôle positif de l'expérience. Des coupes
10 transversales de feuilles blessées montrent également que tous les types cellulaires sont induits par la blessure.

Activité de fragments du promoteur de taille variable et compris entre les bases -1215 et - 406.

Liste des construits possédant le gène rapporteur GUS sous contrôle des
15 séquences promotrices comprises entre -1215 et - 406 (par rapport au site + 1 d'initiation de la transcription) :

Constructions contrôles :

Gène rapporteur GUS dépourvu de promoteur

Gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur minimum du RNA 35 S du CaMV
20 (p min).

Constructions COMTII / GUS utilisées :

COMT II - 956 à + 24

COMT II - 937 à + 24

COMT II - 882 à + 24

25 COMT II - 746 à + 24

COMT II - 676 à + 24

COMT II - 560 à + 24

COMT II - 435 à + 24

COMT II - 1073 à - 406 + promoteur minimum du RNA 35 S du CaMV (p min).

30 Ces constructions correspondent respectivement aux fragments 815 à 1795, 834 à 1795, 889 à 1795, 1025 à 1795, 1095 à 1795, 1211 à 1795, 1336 à 1795 et 698 à 1365 de la SEQ ID NO 1.

L'analyse fonctionnelle de ces différentes constructions a été réalisée sur des tabacs transgéniques en expression stable.

Les études ont d'abord été réalisées sur une population d'environ 20 vitroplants ayant permis la sélection de 3 à 7 lignées par construction qui ont analysés à l'âge de 20 à 45 jours après transfert en serre.

Tableau 7 : Induction par la blessure, le méthyl jasmonate, les UV et le VMT de l'activité GUS dans des vitroplants de tabac transformés par les différentes constructions COMTII / GUS.

10

Constructions COMTII / GUS	Nombre de plantes répondant au signal / nombre total de plantes analysées				
	Témoin en survie	Blessure	Méthyl jasmonate	UV	VMT
COMT II - 1215 à + 24	4 / 15	3 / 7	9 / 15	10 / 15	7 / 15
COMT II - 956 à + 24	4 / 20	6 / 15	9 / 20	15 / 20	7 / 20
COMT II - 937 à + 24	0 / 20	5 / 10	0 / 20	0 / 20	8 / 20
COMT II - 882 à + 24	0 / 20	0 / 17	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 746 à + 24	0 / 20	0 / 4	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 676 à + 24	0 / 20	0 / 13	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 560 à + 24	0 / 20	0 / 8	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 435 à + 24	0 / 20	0 / 5	0 / 20	0 / 20	0 / 20
COMT II - 1073 à - 406	1 / 20	9 / 27	0 / 20	0 / 20	10 / 20
pBI 101 (sans promoteur)	0 / 20	0 / 5	0 / 20	0 / 20	0 / 20
p min / GUS	0 / 20	0 / 11	0 / 20	0 / 20	0 / 20

Pour tester la réponse à la blessure, des feuilles de vitroplants (âgées de 4 à 6 semaines après repiquage) ont été blessées à l'aide de pinces et l'activité histochimique GUS a été révélée 16 heures après blessure.

15 Pour tester la réponse à l'infection, des feuilles de vitroplants ont été inoculées avec une solution de VMT, et l'activité GUS a été révélé 7 jours après inoculation.

Les traitements par les UV et le méthyl jasmonate ainsi que le contrôle non induit ont été effectués sur des feuilles de vitroplants mises en survie dans de l'eau pendant 16 heures.

20

Tableau 8 : Induction de l'activité GUS par les fragments de pectine, chitine ou par la mégaspermine dans des plantes de tabac cultivées en serre et transformées par les différentes constructions COMTII / GUS

Constructions COMTII / GUS	Nombre de plantes répondant au signal / nombre total de plantes analysées		
	Pectines	Chitines	Mégaspermine
COMT II - 1215 à + 24	5 / 6	4 / 6	4 / 6
COMT II - 956 à + 24	4 / 5	4 / 5	4 / 5
COMT II - 937 à + 24	1 / 3	1 / 3	2 / 3
COMT II - 882 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 746 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 676 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 560 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 435 à + 24	0 / 5	0 / 5	0 / 5
COMT II - 1073 à - 406	5 / 5	4 / 5	5 / 5
pBI 101 (sans promoteur)	0 / 5	0 / 5	0 / 5
p min / GUS	0 / 6	0 / 6	0 / 6

5 Les délétions correspondant aux constructions (-882 à + 24), (- 746 à + 24), (- 676 à + 24), (- 560 à + 24) et (- 435 à + 24) entraînent une perte complète de l'inductibilité du promoteur COMTII pour l'ensemble des stress étudiés dans les tableaux 7 et 8. Ceci indique que les séquences nécessaires à l'activité du promoteur se situent entre les bases - 1215 et - 882 par rapport au site d'initiation de la transcription.

10 Dans les cas de l'induction du promoteur par la blessure, le VMT, la mégaspermine, ainsi que par les fragments de pectine et de chitine, seuls les fragments de promoteur (- 956 à + 24), (- 937 à + 24) et (- 1073 à - 406) permettent l'expression de l'activité GUS. De plus, le fragment (- 1073 à - 406) permet l'induction du gène rapporteur par les différents traitements cités ci-dessus, la partie proximale du
15 promoteur comprise entre -406 et +24 ne s'avère donc pas indispensable à l'activité du promoteur. Le fragment -1071 à - 406 pb apparaît donc nécessaire et suffisant pour conférer la sensibilité aux inducteurs étudiés.

L'analyse de la réponse du promoteur vis à vis du méthyl jasmonate et des UV indique que seul le fragment promoteur de - 956 à + 24 pb est fonctionnel. En effet,
20 lorsque le fragment (- 1073 à - 406) est analysé hors du contexte du promoteur total (- 1215 à + 24 pb), aucune induction n'est observée. Il existe donc plusieurs régions

nécessaires à l'inductibilité du promoteur COMTII par le methyl jasmonate et les UV : la région comprise entre -956 et - 937 pb ainsi qu'une ou plusieurs régions situées dans la partie plus proximale du promoteur.

5 **Exemple 4 : Activité anti-infectieuse de COMTII/mégaspermine dans le tabac**

4.1. Clonage d'un ADNc codant pour la β mégaspermine.

 Le clonage de gènes d'élicitrine tels que ceux de la parasiticéine et de la cryptogéine ont montré que ces gènes codaient pour une préprotéine (Kamoun et al., 1993 ; Panabières et al., 1995). La séquence codante de ces élicitines comprend un
10 peptide signal de 20 acides aminés, permettant leur excrétion dans le milieu extra-cellulaire suivi d'une séquence de 98 acides aminés correspondant à la protéine mature.

 La séquence protéique de la β mégaspermine, préalablement déterminée (Kauffmann S., résultats non publiés), montre une forte homologie avec celle de la cryptogéine (Kamoun et al., 1993). Nous avons émis l'hypothèse que les séquences
15 nucléotidiques des gènes correspondants pouvaient être très proches. Des amorces dérivées de la séquence nucléotidique du gène de la cryptogéine ont été synthétisées afin d'isoler par PCR un ADNc codant pour la β mégaspermine. Ces amorces se placent au niveau de la séquence codant pour le peptide signal et contiennent le codon d'initiation de la traduction. Des réactions d'amplification ont été effectuées sur les reverse
20 transcrits de *Phytophthora megasperma* en utilisant une amorce sens dérivée de la séquence nucléotidique de la cryptogéine et l'oligodT comme amorce antisens. Un fragment amplifié d'environ 450 nucléotides a été obtenu. Ce fragment a été cloné dans un vecteur bactérien afin d'être séquencé.

 L'analyse des séquences a révélé que le clone ainsi obtenu code pour une
25 préprotéine comprenant une séquence signal de 20 acides aminés et une séquence de 98 acides aminés correspondant à la β mégaspermine (SEQ ID NO 12). La séquence nucléotidique correspondant au peptide signal présente par ailleurs 100% d'identité avec celle de la cryptogéine.

 L'ADNc natif de la β mégaspermine a été fusionné d'une part au promoteur
30 COMT II et d'autre part au promoteur 35S. Le promoteur COMT II de 1239 pb a été utilisé car il possède tous les éléments régulateurs nécessaires à son induction.

4.2. Obtention des tabacs transgéniques

Des plants de tabac *Nicotiana tabacum* Samsun NN ont été transformés avec les deux constructions via *Agrobacterium tumefaciens*. Six transformants primaires pour chaque construction ont été régénérés et autofécondés. Les plantes issues de la seconde génération présentent un phénotype normal excepté certains individus possédant le gène
5 de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S. Ces plantes présentent un délai de croissance et ont également un système racinaire peu développé. Cependant aucune nécrose tissulaire rappelant celle développée par l'infiltration foliaire et pouvant être liée à l'expression de l'élécitine n'est observée dans les plantes transgéniques.

10 4.3. Analyse de l'expression de la β mégaspermine dans les tabacs transgéniques.

L'expression de la β mégaspermine a été analysée dans les feuilles des plantes transgéniques possédant l'ADNc de l'élécitine sous le contrôle du promoteur 35S par Western-Blot (figure 2A) et par Northern-Blot (figure 2B). De façon surprenante, la β mégaspermine est indétectable dans tous les transformants analysés (figure 2A). Le
15 niveau de transcription de l'élécitine a donc été examinée dans ces plantes par Northern-Blot (figure 2B). Les transcrits ont pu être détectés et le niveau d'expression varie d'un transformant à l'autre. Il apparaît que dans 2 types de plantes (E et F) la taille des transcrits est plus petite que la taille du messenger complet. Dans ce cas, l'absence de protéine pourrait être expliquée par le fait que l'ADNc est tronqué. Pour les plantes A,
20 B, C, D la taille des transcrits correspond à celle de l'élécitine exprimée par le champignon et le taux de transcrits n'est pas négligeable, sauf pour la plante B montrant une très faible proportion de transcrits. Les plantes A qui possèdent les niveaux de transcrits les plus élevés montrent également un retard de croissance. Par la suite, seuls les transformants présentant les transcrits complets de β mégaspermine ont été testés
25 pour leur résistance.

De la même manière, l'expression de la β mégaspermine sous contrôle du promoteur COMT II a été analysée par Western-Blot dans les feuilles des tabacs transgéniques (figure 3). L'expression a été étudiée dans les plantes saines non traitées pour déterminer le niveau de base d'expression de l'élécitine et après blessure pour
30 analyser le niveau d'induction obtenu. Dans les tissus non traités, le niveau de la β mégaspermine est indétectable. Par contre, l'élécitine est détectée en très faible quantité dans les tissus blessés. Ceci est dû à l'activation du promoteur COMT II par la blessure.

L'accumulation de la COMT II a été également examinée dans les mêmes plantes transgéniques en utilisant des anticorps anti-COMT II. De façon surprenante la COMT II est détectée à un niveau non négligeable dans les tissus non traités, alors que normalement seule une très faible activité COMT II est détectée dans les plantes saines non transformées ou transformées avec le gène chimérique COMT II::GUS (Collendavelloo et al., 1981 ; Pellegrini et al., 1993). La COMT II est également produite en quantité plus grande dans les tissus blessés par comparaison aux plantes contrôles blessées de la même façon.

Le promoteur COMT II permet une expression induite de l'élécitine dans les tabacs transgéniques. Ceci a été vérifié pour les 6 transformants. Cependant la quantité d'élécitine détectée dans les plantes après induction est très faible. La présence de COMT II dans les plantes non traitées laisse supposer qu'une très faible quantité d'élécitine (non détectée par la méthode utilisée) est produite dans la plante saine et que cette synthèse est suffisante pour induire le gène COMT II endogène. De plus, il semblerait qu'une expression induite de l'élécitine lors de la blessure permette également une plus forte induction du gène COMT II endogène.

Par ailleurs, l'analyse de la β mégaspermine sur gel dénaturant montre une migration électrophorétique inférieure à celle de la β mégaspermine mature purifiée (figure 3). Cette différence de migration a été évaluée à 3 kD ce qui correspond à la taille du peptide signal. Ce résultat semble indiquer que le peptide signal n'a pas été clivé. Cependant il est possible que la protéine mature soit produite en plus petite quantité par les cellules végétales et que cette quantité se situe en dessous du seuil de détection sur ce Western-Blot.

L'étude de l'expression de la β mégaspermine dans des tabacs transgéniques semble indiquer qu'une expression constitutive d'élécitine ne soit pas tolérée par les plantes et par conséquent ne permette pas son accumulation dans les cellules végétales. Seule une expression induite permet une synthèse de la β mégaspermine à un niveau détectable. Ces résultats pourraient être liés au caractère toxique de la protéine.

4.4. Analyse du niveau de résistance des plantes transgéniques vis à vis de différents agents pathogènes.

Résistance antivirale.

a) Résistance vis à vis du Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT).



Les tabacs transformés possèdent le gène de résistance N et réagissent donc par une HR lors de l'inoculation par le VMT. Dans ces expériences la résistance au virus est quantifiée par la mesure de la taille des lésions 7 jours après infection, lorsqu'elles ont atteint leur taille presque définitive. Plus la résistance développée par la plante est grande, plus les tailles des lésions sont petites, illustrant ainsi un confinement plus important du pathogène au site d'infection. Le promoteur du gène COMT II étant fortement induit autour des lésions lors de la HR au VMT, il devrait permettre une forte expression de la β mégaspermine au site d'infection. Pour le vérifier, les plantes transgéniques a,b,c,d,e et f exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur COMT II et les transformants A, B, C, D possédant l'ADNc de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ont été inoculés par le VMT. Les plantes témoins sont des plantes transgéniques pour le gène chimérique "promoteur COMT II::GUS".

Sept jours après virose, les lésions développées sur les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ne semblent pas différentes de celles des plantes témoins. Par contre des lésions plus petites sont observées sur les plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II par rapport à celles obtenues sur les plantes témoins.

Une analyse statistique de la taille des lésions a été effectuée en mesurant le diamètre de 100 à 150 lésions chez les plantes témoins et chez les plantes transgéniques pour la β mégaspermine. La figure 4 représente la distribution de la taille des lésions mesurées sur les plantes témoins et pour une lignée exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur 35S (plantes A) et une lignée exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur COMT II (plantes b). Cette distribution suit une courbe de Gauss ce qui autorise l'analyse statistique des résultats. Les plantes témoins présentent une taille de lésions dont la moyenne est de $3,3 \pm 0,5$ mm. La moyenne de la taille des lésions obtenue pour les plantes A n'est pas significativement différente de celle des témoins ($3,1 \pm 0,6$ mm) par contre celle obtenue pour les plantes b est fortement inférieure au témoins ($1,4 \pm 0,6$ mm). Les résultats obtenus pour chaque lignée indépendante sont regroupés sur la figure 5 et montrent que tous les transformants (plantes A, B, C et D) possédant l'ADNc de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S présentent une taille de lésions ne différant pas de celle des témoins. En revanche, toutes les plantes exprimant l'élécitine sous le contrôle du promoteur COMT II présentent une taille

moyenne de lésions significativement inférieure à celle des plantes témoins. Cette diminution est plus ou moins importante selon les transformants. Une forte réduction, d'environ 60%, de la taille des lésions est obtenue pour les transformants COMT II::meg a, b, et f et la plus faible observée est de 36% et correspond au transformant COMT 5 II::meg e.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S présentent un niveau de résistance antiviral équivalent à celui des plantes témoins. Par contre, une résistance accrue au VMT est obtenue pour les tabacs transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le 10 contrôle du promoteur COMT II. Cependant tous les lignées transgéniques ne présentent pas le même niveau de résistance. Ceci pourrait être lié à des niveaux d'expression différents de la β mégaspermine dans ces différentes plantes transgéniques.

b) Résistance au Virus de la Mosaïque de la Luzerne (VML).

Nous avons testé la résistance des tabacs transgéniques COMT II::mégaspermine 15 vis à vis d'un autre virus, le VML, qui infecte le tabac de façon systémique. Une dizaine de jours après virose, le VML s'est propagé dans toute la plante et produit au niveau des feuilles non inoculées des symptômes de mosaïque.

Les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II choisies pour ce test correspondent à la lignée b qui présente un niveau de résistance 20 élevé au VMT. Les plantes A possédant l'ADNc de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur 35S ont été également inoculées ainsi que des plantes témoins COMT II::GUS. Pour chaque lignée transgénique, 5 plantes ont été inoculées. Nous avons examiné le phénotype des différentes plantes quinze jours après traitement. A ce stade les symptômes de mosaïque sont bien développés sur les plantes COMT II::GUS. Les 25 plantes transgéniques A montrent une mosaïque similaire aux plantes témoins. Par contre, une réduction de ces symptômes est observée dans les plantes transgéniques b.

La charge virale a été examinée dans les feuilles systémiques de même niveau (3 30^{ème} feuille au dessus de la feuille inoculée). Cette analyse a été effectuée par Western-Blot en utilisant des anticorps dirigés contre la coque protéique du virus (figure 6). La quantité de virus présente dans les différentes plantes transgéniques est évaluée par rapport à la quantité de virus présente dans les plantes témoins. Les résultats obtenus montrent que les plantes exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur

35S ont de 10 à 15 fois moins de virus que les plantes témoins. Cette réduction de la quantité de virus peut paraître importante. Il faut savoir cependant que les quantités de virus produites dans les plantes sauvages peuvent varier dans les mêmes proportions. Par contre les plantes transgéniques exprimant la mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II contiennent 1000 à 10000 fois moins de virus que les plantes témoins. Ceci représente une réduction considérable et très significative de la charge virale.

Ces résultats suggèrent que seules les plantes transformées avec la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur inductible COMT II sont moins sensibles vis à vis d'une infection systémique virale. Ceci montre également une corrélation entre la réduction des symptômes d'infection et la diminution de la charge virale dans ces feuilles.

Résistance antifongique.

Nous avons examiné si la production d'élicitines *in planta* conférait une résistance induite vis à vis d'un champignon du sol, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Ce champignon infecte les plants de tabac par les racines envahissant le système racinaire puis vasculaire provoquant ainsi une sclérose des vaisseaux conducteurs. Les symptômes d'infection se traduisent par une pourriture noire au niveau du collet. Ce mode d'infection est difficile à mettre en oeuvre car il nécessite une concentration en zoospores adéquate et répond à des conditions strictes de température et d'humidité. Un mode "artificiel" d'inoculation consiste à appliquer après décapitation des tabacs le mycélium du champignon au niveau de la tige sectionnée. Après 7 jours les tiges sont prélevées et les symptômes d'infection sont examinés à l'intérieur des tiges.

L'inoculation a été effectuée sur 7 plantes témoins COMT II::GUS. Pour chaque lignée transgénique pour la β mégaspermine, cinq plantes ont été inoculées. Les plantes A, B, C et D possédant la construction "promoteur 35S-mégaspermine" ont été testées. Pour les plantes possédant le gène de la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II, les lignées a et b présentant une forte résistance accrue au VMT ont été choisies ainsi que la lignée c présentant un niveau plus faible de résistance.

La progression des symptômes mesurée dans les tiges des plantes témoins atteint une longueur moyenne de 5,3 cm. Un ralentissement des symptômes d'infection est observé dans les tiges des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le



contrôle du promoteur 35S. Cette diminution est variable d'un génotype à l'autre (figure 7). La progression du champignon est fortement ralentie dans les plantes 35S::meg A (d=0,8cm) et plus faiblement dans les plantes 35S::meg B (d=3,8cm) par rapport aux plantes témoins (d=5,3cm). Les plantes A correspondent aux plantes qui présentent la plus forte proportion de transcrits de β mégaspermine, alors que les plantes B ont un taux très faible de transcrits codant pour l'élécitine. Ceci pourrait suggérer une corrélation entre les niveaux de transcrits d'élécitine détectés (et sans doute les niveaux de β mégaspermine produits même si ceux ci restent sous le seuil de détection) et le niveau de résistance antifongique induit.

La progression du champignon est également fortement ralentie dans les tiges des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II. Nous avons montré par ailleurs que le promoteur COMT II était induit lors de l'infection par *P. parasitica*. Les tiges des transformants COMT II::meg a, b et c sont respectivement infectées sur une longueur de 0,7 cm, 1 cm et de 3,5 cm. Les plantes a et b sont les plus résistantes à l'infection par *P. nicotianae* et correspondent également aux plantes présentant la plus forte résistance au VMT. Ainsi, il apparaît que les mêmes niveaux de résistance relatifs sont détectés avec les deux agents pathogènes testés. Nous pouvons supposer que les niveaux de résistance induits dans ces plantes sont liés au taux d'expression de l'élécitine. Une analyse des niveaux de transcrits par Northern-Blot permettrait peut être de confirmer cette hypothèse, sachant la difficulté de détecter la protéine par Western-Blot.

Ces résultats montrent que l'expression constitutive ou induite de β mégaspermine dans des tabacs transgéniques permet de conférer un niveau de résistance accru vis à vis de d'une infection fongique.

Résistance antibactérienne

Nous avons également testé la résistance des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMT II vis à vis d'une bactérie, *Erwinia carotovora*. Cette bactérie est un agent pathogène bien connu de la pomme de terre et est capable de macérer les tissus végétaux par la synthèse d'enzymes pectinolytiques. Cependant elle peut également infecter d'autres plantes tel le tabac.

Pour ce test, une suspension d'*E. carotovora* a été infiltrée dans les feuilles des plantes transgéniques COMT II::mégaspermine ainsi que dans les feuilles des plantes

contrôles (correspondant aux plantes transgéniques pour le gène chimérique COMT II::GUS). Une population de 7 plantes a été inoculée pour chacun des transformants. Deux jours après inoculation des bactéries, 60% des plantes contrôles (4 plantes sur 7) présentent des symptômes d'infection sévères, les feuilles inoculées sont entièrement macérées et l'infection tend à se propager au niveau de la plante entière. A l'inverse 85% des plantes transgéniques exprimant la β mégaspermine sous le contrôle du promoteur COMTII (6 plantes sur 7) sont résistantes à l'infection bactérienne.

Ces résultats montrent que l'expression induite de l'élécitine accroît fortement la résistance vis à vis d'*E. carotovora*. Nous avons précédemment montré que le promoteur COMT II était inductible par des éliciteurs secondaires parmi lesquels les fragments pectiques. Ainsi nous pouvons supposer que les fragments pectiques produits lors de la lyse des tissus végétaux induisent le promoteur COMT II et par conséquent la synthèse de β mégaspermine. Cependant le mécanisme permettant la mise en place de la résistance antibactérienne reste encore à déterminer.

15

Matériel et méthodes

Criblage d'une banque génomique et identification du clone correspondant au gène exprimé pendant la réponse de défense.

Une banque d'ADN génomique de tabac (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) construite dans λ -EMBL3 (Clontech) a été criblée avec une sonde radioactive d'ADNc de COMT II (Pellegrini & al., 1993). Six clones génomiques positifs ont été isolés après quatre tours de purification. Ces clones purifiés ont été testés par PCR pour identifier celui qui comprend le gène COMT exprimé pendant la réponse d'hypersensibilité (HR) des feuilles de tabac au VMT. Les amorces 5' et 3' pour l'analyse PCR sont représentés par les oligonucléotides 1 et 2 ci-dessous (SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 5 respectivement) :

Oligo 1 : 5' CGTTTCGCAA TGTGATTGA TC 3'

Oligo 2 : 5' CTCAAAATGA CATCCTTTCA TAC 3'

Ils sont dérivés de la région non traduite en 3' de l'ADNc de COMT II. L'analyse PCR est effectuée à 62 °C (température de fusion théorique) de manière à promouvoir une hybridation spécifique. Un seul clone permet l'amplification du fragment attendu de 400 paires de bases comme le fait l'ADNc employé comme contrôle positif. Le clone

génomique de COMT II a été purifié sur Quiagen tip selon le protocole décrit par le fabricant et sous cloné dans le site de restriction *Sall* du vecteur plasmide puc 18.

Séquençage de l'ADN.

Le séquençage de l'ADN a été effectué sur l'ADN double brin dénaturé selon la méthode de Sanger & al. (1977) en employant le kit " rhodamin dye terminator cycle ready " avec l'ADN polymérase FS ampliPac (Perkin-Elmer, P/N402078) et un séquenceur Applied Biosystems 373 (Perkin-Elmer). La séquence a été déterminée sur les deux brins avec des recouvrements en employant des amorces synthétisées à partir de séquences déjà déterminées.

10 Analyse des produits d'extension d'amorces.

La réaction d'extension des amorces a été effectuée sur l'ARN total selon la méthode décrite dans Current Protocols in Molecular Biology (Triezenberg, 1992). L'ARN total isolé de feuilles de tabacs infectées par le VMT et de feuilles de tabacs non infectées (comme contrôle négatif) a été hybridé à l'oligonucléotide suivant (SEQ ID NO 6), complémentaire de l'ARNm du COMT II et marqué à l'extrémité 5' :

Oligo 3 : 5' CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC 3'

Le produit de l'extension a été séparé sur un gel de polyacrylamide à 6 %. La localisation du site d'initiation de la transcription a été déterminée sur la base de la comigration des produits d'extension avec l'échelle de séquence de la obtenue à partir de la région correspondante du gène (Sanger & al., 1977).

Construction des plasmides.

Les versions tronquées du promoteur COMTII ont été amplifiées par PCR en employant les amorces PAS1 en 3' et PS1, PS2, PS3 et PS4 en 5' représentés ci-après (SEQ ID NO 7 à 11 respectivement), conduisant respectivement à l'amplification des fragments nucléotidiques de longueurs suivantes : -1215/+24, (nouveaux construits supérieurs à 600 bp) -420/+24, -313/+24 et -121/+24 (numérotation relative au site d'initiation de la transcription).

PAS1 : 5' GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG 3'

PS1 : 5' AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCAACAAT 3'

30 PS2 : 5' TGT TTGGTGT TATGCTTCCG TCCT 3'

PS3 : 5' AAAAAGCTTT TTTAGGATGG AGTACAGCC 3'

PS4 : 5' TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT 3'

Les construits -1728/+24, -1471/+24, -956/+24, -937/+24, -882/+24, -746/+24, -676/+24, -560/+24, -435/+24, ont été obtenus avec les amorces PAS2 en 3' et respectivement les amorces PS5, PS6, PS7, PS8, PS9, PS10, PS11, PS12 et PS13 en 5' présentées ci après (SEQ ID NO 15 à 24 respectivement):

- 5 PAS2: 5' CGCGGATCCC CTTTGTAGAGT GTTTTGTGTTA GGC 3'
 PS5 : 5' ACGCGTCGAC GTTAGGGACA ATCTATAGTG TCAC 3'
 PS6 : 5' ACGCGTCGAC GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGG 3'
 PS7 : 5' ACGCGTCGAC GCTGGTTAGG TGAAGTAAAG CATG 3'
 PS8 : 5' ACGCGTCGAC GCATGTTATA TGAGGAAAGT ACG 3'
 10 PS9 : 5' ACGCGTCGAC GCAGCCAGCA CAAGCAAATT CGC 3'
 PS10: 5' ACGCGTCGAC GACTTTAACA CACCAACTCC C 3'
 PS11: 5' ACGCGTCGAC CGGATCTAGA ATTTGGGTTC ATTC 3'
 PS12: 5' ACGCGTCGAC GTGTATACTC CACGTCTCCG GATAC 3'
 PS13: 5' ACGCGTCGAC GTTCAATGTT AGGTGTGTTT GG 3'

- 15 La séquence -1073/-406 qui a été placée en amont du promoteur 35S minimum a été obtenue en utilisant l'amorce PAS3 en 3' et l'amorce PS14 en 5' (SEQ ID NO 25 et 26):

PAS3 : 5' CGCGGATCCG CTTAACACCA AACACACCTA ACATTG 3'
 PS14 : 5' ACGCGTCGAC CAGTGGTGAG TTTAGCTGTC 3'

- 20 L'amplification a été effectuée pendant 30 cycles avec une étape initiale de 4 min à 95°C et une étape finale de 5 min à 72°C, en utilisant le clone génomique comme matrice. Chaque cycle consiste en 1 min à 95°C suivie d'1 min d'hybridation puis de 1,5-2 min à 72°C. L'étape d'hybridation est réalisée à 54°C, 59°C, 55°C, et 50°C pour amplifier, respectivement, les fragments -1215/+24, -420/+24, -313/+24 et -121/+24.
- 25 Pour tous les autres fragments du promoteur, la température d'hybridation est de 60°C. Après sous-clonage dans le plasmide pGEM-T (Promega) et amplification dans *E. Coli*, le fragment de promoteur -1215/+24 est digéré par *Sall* et *XbaI*, les sites correspondants étant présents dans les amorces PS1 et PSA1 respectivement. Les fragments de promoteur de 420, 313 et 121 paires de bases sont digérés avec *HindIII* et
- 30 *XbaI* (le site pour *HindIII* est présent dans les amorces PS2, PS3 et PS4, et le site *XbaI* dans l'amorce PAS1). Les fragments -1768/+24, -1471/+24, -956/+24, -937/+24, -802/+24, -746/+24, -676/+24, -560/+24 et -435/+24 sont digérés par *BamHI* présent dans PAS2 et PAS3 et par *Sall* présent dans les amorces PS5 à PS14. Tous les fragments sont clonés dans le plasmide pBI101 (Qiagen) de façon à créer une fusion

transcriptionnelle avec le gène rapporteur GUS. Tous les construits sont séquencés pour confirmer leur structure et les frontières de jonction.

Le construit constitué du promoteur 35S du CaMV en amont du gène de la mégaspermine a été obtenu en remplaçant le gène Gus par le gène de la mégaspermine
5 (SEQ ID NO 12) dans le plasmide pBi121(Clontech).

Clonage de l'ADNc de *Phytophthora megasperma*

10 10 mg d'ARN totaux de *Phytophthora megasperma* sont utilisés comme matrice pour la synthèse du premier brin. Les ARN totaux sont chauffés 3 min à 65°C, refroidis sur glace, et incubés 2 h à 42°C dans 50 ml de tampon de transcription inverse (50 mM Tris-HCL pH 8,3 - 15 mM MgCl₂ - 75 mM KCL - 1 mM DTT) contenant 1 mM de chaque dNTP, 40 pmol d'amorce anti-sens correspondant à l'oligodT, et 20 U de transcriptase inverse d'AMV (virus de la myéloblastose aviaire). Le mélange est chauffé a 94°C pour stopper la réaction. Après précipitation du mélange réactionnel à l'éthanol, le culot est dissous dans de l'eau stérile distillée.

15 La synthèse du second brin est initiée par la Taq ADN polymérase. 1/20 du produit de transcription inverse est utilisé pour l'amplification par PCR dans 50 ml de tampon (10 mM Tris-HCL pH 8,3 - 50 mM KCL - 1,5 mM MgCl₂ - 0,01% BSA), 200 mM de dNTP, 0,1 mM d'amorces sens et anti-sens et 1 unité de Taq. L'amorce sens (5' ATGAACTTCACCGCTCTGCT 3') dérive de la séquence nucléotidique de la
20 cryptogéine, l'amorce anti-sens correspond à l'oligodT possédant les sites de restriction SstI-EcoRI-HindIII à son extrémité 5'. Le mélange réactionnel est chauffé pendant 3 min à 94°C, puis est soumis à 30 cycles de réaction comprenant chacun 3 étapes : 1 min à 94°C, 1 min à 49°C et 1 min à 72°C. Après le dernier cycle, l'élongation est poursuivie 10 min à 72°C. Le produit d'amplification obtenu est ensuite cloné dans le
25 vecteur pGEM (Promega) afin d'être séquencé.

Transformation des plantes

Les différents construits promoteur COMTII-GUS obtenus précédemment dans le plasmide pBI101 sont introduits dans une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pPM6000) (Rossi & al., 1993) par électroporation (Nagel & al., 1990). Les
30 plants de tabac (*Nicotiana tabacum* cv Samsun NN) sont transformés par infiltration d'*Agrobacterium* sur des plants de 10 jours (Rossi & al., 1993). Les plantes sont régénérées sur un milieu Murashige & Skoog (MS) (GIBCO BRL) supplémenté avec du

saccharose (30 g/l pour la formation des tiges et 15 g/l pour la formation des racines), de la 6-benzylaminopurine (Serva) (2 mg/ml), et de l'acide naphthalène acétique (Serva) (0,05 mg/ml). La kanamycine (150 mg/ml) est employée comme agent de sélection durant les étapes de régénération *in vitro* et de propagation. Des plantes contrôles ont été
5 préparées par transformation avec le vecteur vide pBI101 ou le vecteur p min GUS (contenant le gène rapporteur GUS sous contrôle du promoteur minimum du RNA 35 S du CaMV). Sept à 20 transformants indépendants sont régénérés pour chaque construit. Les transformants primaires sont auto fécondés et les graines F1 sont germées sur un milieu MS comprenant 300 mg/l de kanamycine.

10 **Essais enzymatiques**

La localisation histochimique du GUS dans les plantes transgéniques est effectuée selon la méthode décrite par Jefferson & al. (1987). La réaction histochimique est incubée dans l'obscurité à 37°C pendant 12 heures. Les tissus sont rincés, d'abord avec un tampon phosphate 50 mM pour terminer la réaction, puis plusieurs fois avec de
15 l'éthanol de 70% à 90% pour éliminer la pigmentation des tissus. Après la réaction histochimique, les tissus sont rincés dans l'éthanol à 70% et sont inclus dans une historésine de fixation (Jung) pour des sections transversales de feuilles. Les blocs d'historésines sont coupés avec un microtome et des photographies sont prises à un grossissement de 10 à 40 fois par un microscope binoculaire.

20 Le dosage des activités COMTII et GUS a été effectué sur 100mg de tissus. Le tissu est homogénéisé dans un tampon phosphate de sodium 100mM à pH 7,5 et 10 mM de DTT après addition de polyclar AT (Serva) et de quartz. Les extraits bruts sont clarifiés par centrifugation et par filtration sur de la laine de verre. La mesure des activités GUS et COMTII est effectuée sur les mêmes extraits bruts. Pour la mesure de
25 l'activité COMTII, un aliquote de l'extrait protéique est ajouté à 1 ml de tampon phosphate comprenant 100µM de catéchol, 50µM de S-adenosyl-L-méthionine tritiée ($1,5 \cdot 10^5$ cpm/ml) et incubé pendant 3 heures à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 100µl d'acide sulfurique 9M. Le produit radioactif de la réaction, l'acide ferulique, est extrait par 5 ml d'une solution NA de scintillation (Beckman) et la radioactivité est
30 comptée sur un appareil Beckman LS 9000. La mesure fluorimétrique de l'activité GUS est effectuée sur les mêmes échantillons selon la procédure de Jefferson & al. (1987). Le contenu protéique est déterminé par la méthode de Bradford (1976) en employant les

réactifs Biorad.

Construits COMTII-meg et 35S-meg

Le vecteur pGEM (Promega) ne possédant pas les sites de clonage compatibles ceux du pBI101, une étape de sous clonage dans le vecteur Bluescript (pSK) a été
5 nécessaire. L'insert BamHI/SstI provenant du pSK::mégaspermine a été purifié pour le clonage dans le vecteur binaire pBI101 (Clontech).

Le vecteur pBI101::*COMT II-GUS* précédemment construit et correspondant au promoteur -1215/+24 fusionné au gène rapporteur GUS a été utilisé pour obtenir le gène chimérique *comt II-meg*. Le gène GUS est excisé par digestion du plasmide binaire par
10 BamHI et SstI. Un site SnaBI présent dans le gène GUS permet de couper celui-ci et évite qu'il se religue avec le plasmide binaire puisque aucune étape de purification du vecteur n'est effectuée. Les enzymes de restriction sont inactivées par la chaleur. L'ADN digéré est extrait par un mélange phénol : chloroforme (1 : 1), puis chloroforme : alcool isoamilique (24 : 1) et précipité à l'éthanol. L'ADN digéré est remis en suspension dans
15 de l'eau stérile et ligué avec l'insert.

Le vecteur pBI121 (Clontech) portant le gène *35S-GUS* a été utilisé pour obtenir le gène chimérique *35S-meg*. Le clonage est effectué selon la méthode décrite précédemment.

Les constructions ont été ensuite vérifiées par séquençage.

20 Plants de tabac.

Les plants de tabac transgéniques (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) sont cultivés in vitro sous un cycle de lumière de 12h(24°C)/12(20°C) pendant 5 semaines après la germination. Ils sont propagés sur un milieu MS avec addition de kanamycine (150 mg/l) comme agent de sélection. Ils sont ensuite transférés en serre et cultivés en
25 sol sous un cycle de lumière 16h/8h à 22°+2°C.

Analyse des ARN de plantes par Northern

Extraction des ARN totaux

Les tissus sont finement broyés dans de l'azote liquide, puis dans 1 à 2 volumes
30 de tampon d'extraction (0,2 M borate de sodium pH 9 - 30 mM EGTA - SDS 1% - 5 mM DTT). Le mélange est versé dans un tube contenant 1 volume de phénol/chloroforme (1:1), vortexé, puis centrifugé 10 min à 5000g. Une deuxième

extraction au phénol/chloroforme (1:1) est réalisée, suivie d'une troisième au chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Les ARN présents dans le surnageant sont spécifiquement précipités par addition de 1 volume d'une solution de LiCl (4 M) EDTA (10 mM) pendant une nuit à 0°C. Le tout est centrifugé 30 min à 10000g et le culot est
5 lavé avec une solution de LiCl (2 M), EDTA (5 mM). Les ARN totaux sont repris dans de l'eau et à nouveau précipités à l'éthanol 70%, NaCl (0,2 mM). Après centrifugation 30 min à 10000 g, le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70%, puis repris dans 50 µl d'eau. Les ARN sont dosés en mesurant l'absorbance d'une solution diluée à 260 (1 unité DO₂₆₀ = 40 µg/ml d'ARN), et leur intégrité est vérifiée par migration sur un gel
10 d'agarose non dénaturant coloré au BET.

Electrophorèse

Les ARN sont séparés sur gel d'agarose dénaturant préparé dans un tampon MOPS x1 contenant 16% de formaldéhyde. Des gels de 1,2% d'agarose (p/v) ont été utilisés. Les échantillons d'ARN sont dénaturés 15 min à 65°C en présence de 3
15 volumes de solution de dénaturation (MOPS x5 10µl, formamide 50µl, formaldéhyde 16µl) par volume d'ARN, et refroidis rapidement dans la glace. Du tampon de charge est ajouté (MOPSx1, glycérol 50 % , bleu de bromophénol 0,05 %) à raison de 1/10 du volume. Après migration dans du tampon MOPS x1, le gel peut être coloré au BET (0,5 µg/ml) 1 à 2 min, puis abondamment lavé à l'eau stérile. Les ARN sont alors visualisés
20 sous lumière UV.

"Northern Blot"

La technique du "Northern-blot" permet de détecter, parmi les ARN totaux, les messagers homologues à une sonde d'ADN radioactive. Celle ci est réalisée à l'aide du kit de "Random Priming" (Amersham) en suivant le protocole fourni.
25 10 µg d'ARN totaux de tige ou de feuille sont déposés sur gel d'agarose 1,2% (p/v) dénaturant ainsi qu'un marqueur de taille d'ARN (Promega) déposé en bordure du gel. Après migration, le gel est rincé à l'eau stérile afin d'enlever l'excès de formaldéhyde. La bande de migration correspondant au marqueur de taille est découpée, colorée au BET et photographiée.

30 Les ARN sont transférés par capillarité pendant 5 h sur une membrane de Nylon positivement chargée (Hybond N⁺, Amersham) avec du tampon SSC x20. Après transfert la membrane est rincée dans le tampon SSC x2 et les ARN sont fixés de façon

covalente sur la membrane de nylon par exposition à la lumière ultraviolette (1200 J, UV Stratalinker 2400, Stratagene). La membrane est hybridée à une sonde radioactive et traitée comme décrit dans Sambrook et al..

5 **Analyse des protéines de plantes par Western**

Extraction des protéines foliaires

L'extraction peut se faire immédiatement après la récolte ou sur des échantillons congelés. 150 g de tissus foliaires sont broyés au mortier dans du tampon acétate de sodium 0.5 M pH 5.2 contenant du 2-β-mercaptoéthanol (15 mM) et du charbon actif.
10 Le volume de tampon est ajusté de manière à obtenir un broyat fin et homogène. Celui-ci est ensuite filtré sur gaze puis centrifugé pendant 30 min à 15 000 g. Le surnageant constituant l'extrait brut est alors analysé.

Dosage des protéines

La concentration protéique des extraits bruts est dosée par la méthode de
15 Bradford (1976) dans des plaques de microtitration : à 10 µl d'un extrait à tester sont ajoutés 200 µl de réactif de Bradford x1 (Biorad). 2 µl d'extrait brut de feuille sont complétés à 10 µl par du tampon. Chaque échantillon est testé trois fois. Après 5 à 10 min, la plaque est lue au spectrophotomètre MR 700 (Dynatech) avec le filtre 5 (660 nm). Le blanc est constitué de 10 µl de tampon et les valeurs sont comparées à une
20 gamme étalon réalisée avec de la sérum-albumine bovine (SAB, Sigma).

Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant

L'analyse sur gel permet de déterminer la masse moléculaire des protéines en comparant leur mobilité relative à celles de protéines de masse moléculaire connue. A l'extrait protéique est ajouté 20% (v/v) de tampon de charge (60 mM Tris-HCl pH 6.8,
25 5% (v/v) 2-β-mercaptoéthanol, 10% (v/v) glycérol, 0.01% (v/v) bleu de bromophénol, 1% SDS). Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 1 min avant d'être déposés. Les gels (0.75 mm x 7 cm x 9 cm) sont coulés entre une plaque de verre et une plaque d'alumine. Le tampon d'électrophorèse est composé de 192 mM glycine, 25 mM Tris et 0.1% SDS. La migration verticale est réalisée dans une cuve d'électrophorèse Hoeffner à
30 une intensité de 20 mA par gel pour une tension de 100 à 160 V.

Transfert et immunodétection des protéines sur nitrocellulose (Western-Blot)

Après migration électrophorétique sur gel d'acrylamide, les protéines peuvent être transférées, en milieu liquide dans le tampon de transfert (0,16 M Tris - 1,20 M glycine), sur membrane de type nitrocellulose ou nylon PVDF (Immobilon, Millipore). Avant le transfert le gel est équilibré dans le tampon de transfert. La membrane PVDF
5 est activée 1 min dans le méthanol puis équilibrée également dans le tampon de transfert. L'électrotransfert s'effectue pendant 90 min à 150 mA.

L'immunodétection a été réalisée grâce à des anticorps spécifiques dirigés contre la mégaspermine ou la protéine de coque du VML. La révélation est effectuée par chimiluminescence avec le kit ECL (Amersham).

10

Traitement des plantes.

Avant le traitement, les plantes sont conditionnées quelques jours dans une logette climatisée à $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sous une luminosité de 5000 lux et une photopériode J/N de 16h/8h. Ces conditions sont maintenues durant l'infection, à l'exception de
15 l'infection par *Erwinia carotovora*.

Inoculation du virus de la mosaïque du tabac (VMT)

Les feuilles de plants de tabac cultivées en serre et âgées de 6 semaines, sont frottées à l'aide d'un coton préalablement imbibé dans une suspension de VMT purifié (souche commune U1 0,1 à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) contenant un abrasif, la célite (10 mg/ml). Les
20 feuilles de vitroplants de tabac, âgés de 6 à 7 semaines après repiquage, sont frottées à l'aide d'une spatule en verre fritté préalablement immergée dans une suspension de VMT purifié (souche commune U1 à 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, filtrée sur membrane de 0,45 μm) et un abrasif, la célite (10 mg / ml). Après quelques minutes de contact, les feuilles sont rincées à l'eau pour enlever l'excès de célite et de particules virales.

Inoculation du virus de la mosaïque de la luzerne (VML)

Les feuilles de plants de tabac, âgés de 6 semaines, sont frottées à l'aide d'une spatule en verre trempée dans une solution tampon contenant l'ARN viral (1 à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et un abrasif, la célite (10 mg/ml). L'inoculum par feuille (pour une plante) correspond à 200 ml de solution tampon : Kpi , pH 7,2, 0,04M, 1 ml RNAsine, DTT 1mM final,
30 Macaloïd (0,05%), ARN total de levure 0,25 mg/ml, ARN viral (1 à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Inoculation de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

Le mycélium de *P. p. nicotianae* est cultivé sur boîte de Pétri contenant un milieu solide (milieu avoine : 100 g de graines d'avoine broyées sont mises en suspension dans 1 l d'eau distillée. Le milieu est filtré sur gaze. Le milieu est autoclavé
5 après addition de 15 g d'agar).

L'inoculation a été effectuée après décapitation des plants de tabac. La tige de plants de tabac âgés de 10 semaines est sectionnée sous le bourgeon apical. Une pastille de mycélium de *P. p. nicotianae* est prélevée en périphérie d'une culture de 7 jours sur milieu d'avoine et est déposée sur la section de la tige. La tige mise en contact avec la
10 pastille de mycélium est en capsulée dans une feuille d'aluminium afin d'éviter une dessiccation trop rapide des tissus au site d'inoculation.

Inoculation d'*Erwinia carotovora*

La souche d'*Erwinia carotovora* est mise en culture toute une nuit à 28°C dans du milieu LB. Après centrifugation, le culot bactérien est repris dans une solution de
15 MgSO_4 (10mM) pour obtenir une concentration bactérienne approximative de 1.10^7 cfu (colony-forming units)/ml. Les feuilles de plants de tabac âgés de 4 à 5 semaines sont infiltrées par cette suspension bactérienne. Un seul site est inoculé par feuille, en infiltrant à l'aide d'un pipette-man 50 ml de la suspension bactérienne. Les plantes sont placées ensuite en logettes en condition d'humidité élevée et à une température de 26°C
20 $\pm 1^\circ\text{C}$ pendant l'infection.

Traitement par un éliciteur : Des solutions sont infiltrées par un seringue équipée d'une aiguille fine dans le mésophyle des feuilles. Les zones infiltrées sont délimitées avec un marqueur "felt-tip". Les zones infiltrées sont récoltées 16 heures après le traitement. Les feuilles sont traitées avec une solution de β -mégaspermine, un
25 éliciteur protéique purifié d'un milieu de culture de *Phytophthora megasperma* (Kauffmann & al., 1993), ou d'oligosaccharides comme les oligomères de chitine (100 $\mu\text{g/ml}$), des fragments de glucane (200 $\mu\text{g/ml}$), et des fragments de pectines (200 $\mu\text{g/ml}$). Les plantes témoins sont infiltrées avec de l'eau.

Blessure : Des feuilles totalement développées sont blessées avec un hémostat ou
30 percées avec des aiguilles. Les feuilles blessées sont ensuite récoltées 16 ou 24 heures après blessure pour les analyses fluorimétriques ou histochimiques.

Traitement UV : La partie supérieure de plantes transgéniques âgées de 5

semaines est exposée aux rayons UV ($\lambda=254\text{nm}$) pendant 10 minutes puis les plantes sont placées dans l'obscurité jusqu'à la collecte des tissus 16 heures suivant le traitement.

Traitements chimiques : (1) Des solutions de SA (1mM) ou de INA (50mM) sont
5 infiltrées dans les feuilles de tabac en employant le protocole décrit pour le traitement par des éliciteurs. (2) Sous des conditions de culture identiques, on pulvérise sur les plantes transgéniques des solutions de SA (10mM), INA (1mM) ou BTH (50mM). Les tissus sont recueillis 16 heures après traitement. Les plantes traitées avec de l'eau sont utilisées comme témoin. (3) Des plantes âgées de sept semaines ou des feuilles de
10 vitroplants en survie sur de l'eau sont transférées dans des boîtes transparentes et hermétiques et soumises à une atmosphère de 3,5mM de MeJa (Serva). Les tissus sont prélevés à différents temps suivant le traitement. Les plantes témoins sont placées dans les mêmes boîtes sans MeJa.

15 **Références :**

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1998) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Bradford M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem. 72,
20 248-254.
- Collendavelloo J, Legrand M, Geoffroy P, Barthelemy J & Fritig B (1981). *Purification and properties of the three o-diphenol O-methyltransferases of tobacco leaves*. Phytochemistry 20, 611-616.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987). *GUS fusions : β -glucuronidase*
25 *as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J. 6, 3901-3907.
- Kamoun S, Young M, Glascock CB & Tyler BM (1993). *A gene encoding a host-specific elicitor protein of Phytophthora: host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal pathogens*. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 15-25.
- Kauffmann S., Baillieul F., Genetet I., Kopp M. & Fritig B. (1993). *Two proteins*
30 *secreted by Phytophthora megasperma elicit and defense-related responses in tobacco*. In Mechanisms of plant defense responses, B. Fritig and M. Legrand, Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 140-143.

- Nagel R., Elliott A., Masel A., Birch R.G. & Manners J.M. (1990). *Electroporation of binary Ti plasmid vector into Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 67, 325-328.
- Panabières F, Marais A, Berre JYL, Penot I, Fournier D & Ricci P (1995).
- 5 *Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitors, proteins inducing a hypersensitive-like response in tobacco*. Mol. Plant Microbe Interact. 8, 1995.
- Pellegrini L., Geoffroy P., Fritig B. & Legrand M. (1993). *Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco*
- 10 *(Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment*. Plant Physiol. 103, 509-517.
- Rossi L., Escudero J., Hohn B. & Tinland B. (1993). *Efficient and sensitive assay for T-DNA dependant transient gene expression*. Plant Mol. Biol. Rep. 12, 220-229.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory*
- 15 *manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sänger F., Nicklens S. & Coulson A.R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.
- Trienzenberg S.J. (1992). *Primer extension*. In Current Protocols in Molecular Biology. J. Wiley & Sons eds. 20.4.8.1

Revendications

1. Fragment d'acide nucléique comprenant un promoteur de plante inductible, caractérisé en ce que ledit promoteur inductible est constitué par le promoteur d'un gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (COMT II) de plante.
- 5 2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un promoteur de COMT II de plante.
3. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le promoteur est activé par les blessures, les infections virales, les agressions aux rayons UV, les agressions chimiques, ou les agressions par pathogène,
10 un insecte ou un nématode
4. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la COMTII de plante est une COMT de plante qui n'est pas exprimée dans les plantes saines non traitées, mais qui est exprimée à la suite d'une agression mécanique, chimique, ou par un pathogène, un insecte ou un nématode.
- 15 5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la plante est une plante monocotylédone ou dicotylédone, en particulier choisie parmi le riz, le blé, l'orge, le tournesol, le maïs, le tabac, le colza, le soja ou *Arabidopsis thaliana*.
6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce
20 que la plante est une plante dicotylédone, de préférence le tabac.
7. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence en 5' du site d'initiation de la traduction ou codon " start " (ATG) de la séquence codante de la COMTII permettant la transcription et l'expression de ladite séquence codante.
- 25 8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1 à 7, caractérisé en ce que le promoteur comprend une séquence de plus de 600 nucléotides en amont de l'ATG de la COMTII, de préférence de plus de 1000 nucléotides en amont de l'ATG, plus préférentiellement de plus de 1200 nucléotides en amont de l'ATG.
9. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 8,
30 caractérisé en ce que le promoteur comprend un site d'initiation de la transcription situé à moins de 100 nucléotides en amont de l'ATG, avantageusement à environ 90 nucléotides en amont.

10. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'extrémité 3' du promoteur est située entre le site d'initiation de la transcription et l'ATG.

11. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce que
5 l'extrémité 3' du promoteur est située entre 10 et 50 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription, plus préférentiellement entre 20 et 40 nucléotides en aval, encore plus préférentiellement entre 20 et 30 nucléotides en aval.

12. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il est constitué par le promoteur COMTII de tabac défini par la
10 séquence nucléotidique en amont de l'ATG représentée par l'identificateur de séquence 1 (SEQ ID NO 1), les séquences capables de s'hybrider de manière sélective à ladite séquence et les séquences homologues.

13. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 12, caractérise en ce qu'il est constitué, par la séquence comprise entre les nucléotides 557 et 1796 de
15 l'identificateur de séquence n° 1

14. Gène chimère (ou cassette d'expression) fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes comprenant dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', caractérisé en ce que la séquence de régulation en 5' comprend le fragment d'acide nucléique selon
20 l'une des revendications 1 à 13.

15. Gène chimère selon la revendication 14, caractérisé en ce que la séquence codante comprend une séquence codante pour un gène rapporteur ou une séquence codante pour une protéine d'intérêt.

16. Gène chimère selon la revendication 15, caractérisé en ce que la protéine
25 d'intérêt est une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.

17. Gène chimère selon la revendication 16, caractérisé en ce que la protéine ou peptide d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines.

18. Gène chimère selon la revendication 17, caractérisé en ce que le peptide éliciteur fongique est la mégaspermine.

19. Gène chimère selon la revendication 18, caractérisé en ce que la

mégaspermine est représentée par l'identificateur de séquence n° 13 (SEQ ID 13).

20. Gène chimère selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'ADN représentée par l'identificateur de séquence n° 14 (SEQ ID 14).

21. Gène chimère fonctionnel dans les cellules végétales et les plantes
5 caractérisé en ce qu'il comprend dans le sens de la transcription une séquence de régulation en 5' comprenant un promoteur inductible, une séquence codante pour un éliciteur et une séquence de régulation en 3'.

22. Gène chimère selon la revendication 21, caractérisé en ce l'éliciteur est défini dans les revendications 17 à 19.

10 23. Gène chimère selon l'une des revendications 21 ou 22, caractérisé en ce que le promoteur inductible est choisi parmi les promoteurs de phénylalanine ammoniac lyase (PAL), d'HMG-CoA reductase (HMG), de chitinases, de glucanases, d'inhibiteurs de protéinase (PI), de gènes de la famille PR1, de la nopaline synthase (nos) ou du gène vspB, le promoteur HMG2, le promoteur de la beta-galactosidase (ABG1) de pomme ou
15 le promoteur de l'acétyl-coA carboxylate synthase (ACC synthase) de pomme.

24. Vecteur de clonage et/ou d'expression pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce qu'il contient au moins un gène chimère selon les revendications 14 à 23.

25. Procédé de transformation des cellules végétales, caractérisé en ce qu'il
20 consiste à intégrer au génome des dites cellules végétales au moins un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 23.

26. Cellules végétales transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un gène chimère selon l'une des revendications 14 à 23.

27. Plantes transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un gène
25 chimère selon les revendications 14 à 23.

28. Plantes, caractérisées en ce qu'elles contiennent des cellules transformées selon la revendication 26 ou obtenues par le procédé selon la revendication 25.

29. Plantes selon la revendication 28, caractérisées en ce qu'elles sont régénérées à partir des cellules transformées selon la revendication 19 ou obtenues par le
30 procédé selon la revendication 18.

30. Plantes issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées selon la revendication 29.

31. Plantes selon l'une des revendications 27 à 30, caractérisées en ce qu'elles sont du type monocotylédones, en particulier les céréales, la canne à sucre, le riz et le maïs, ou dicotylédones, en particulier le tabac, la soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle.

5 32. Graines des plantes selon l'une des revendications 27 à 31.

1/5

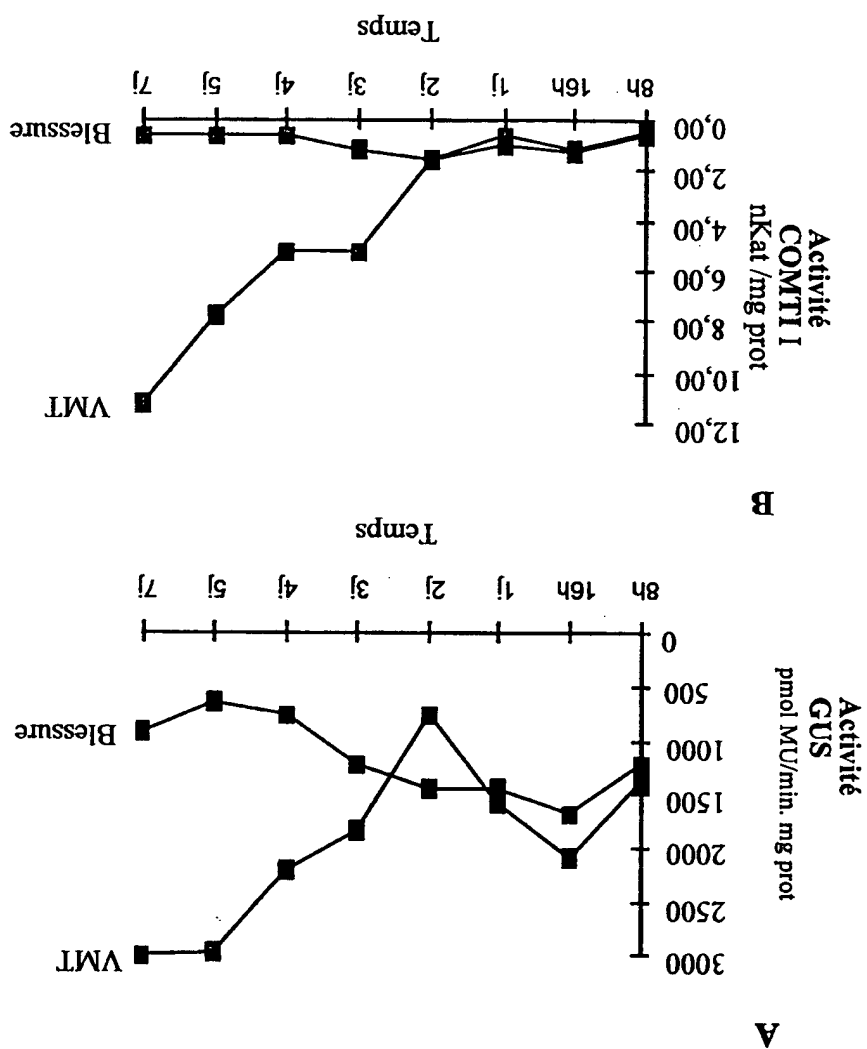
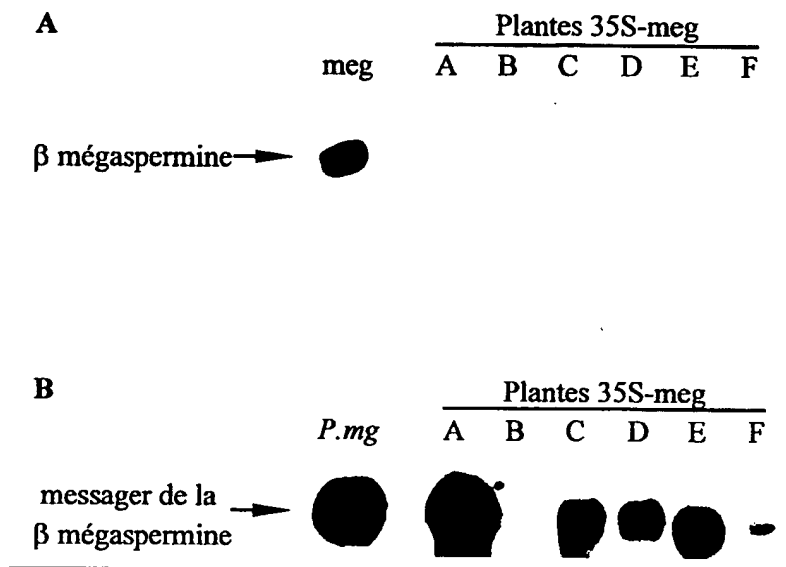
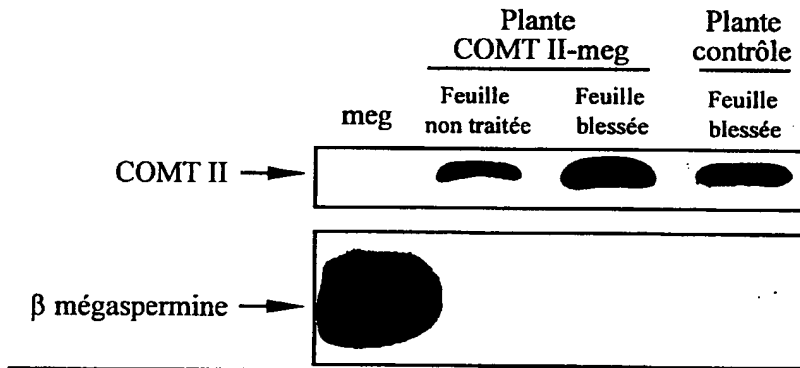
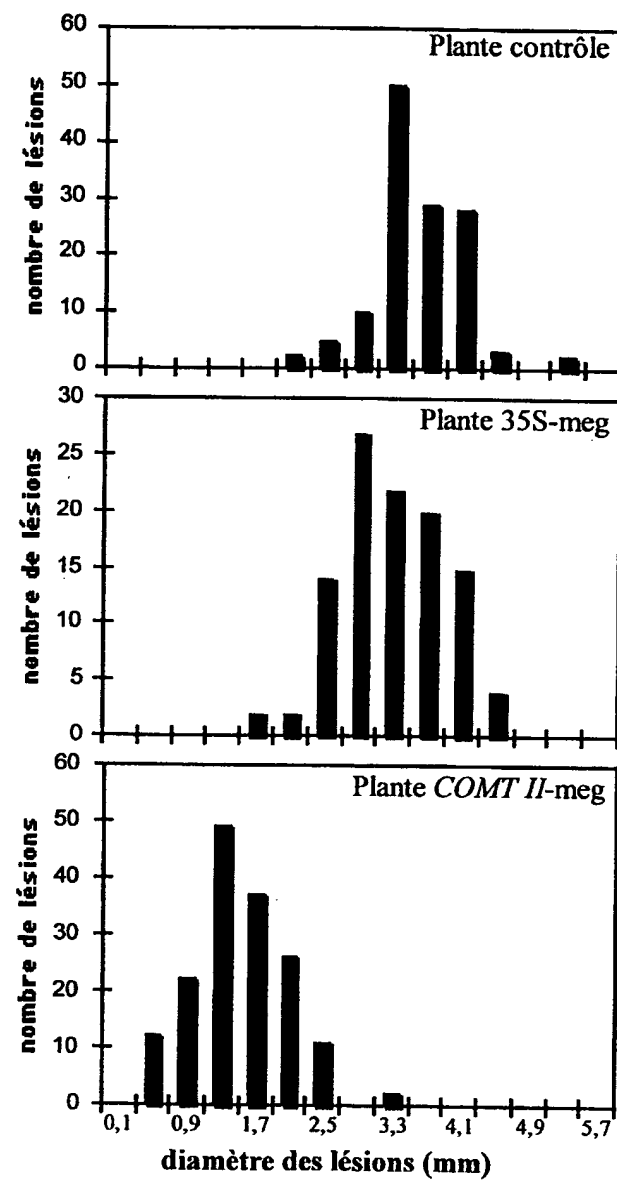


Fig 1

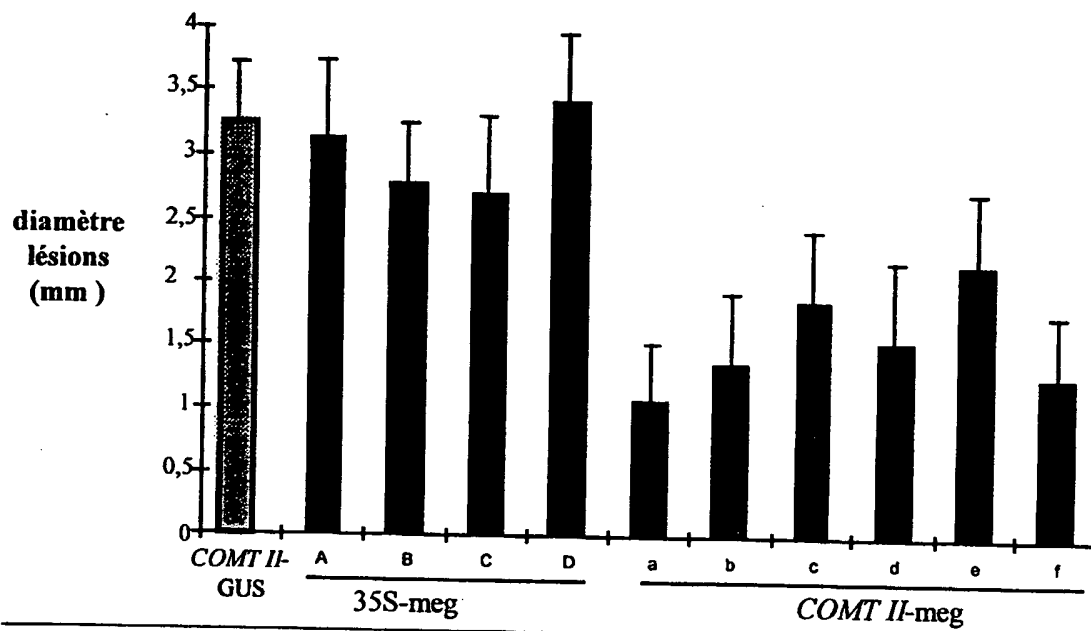
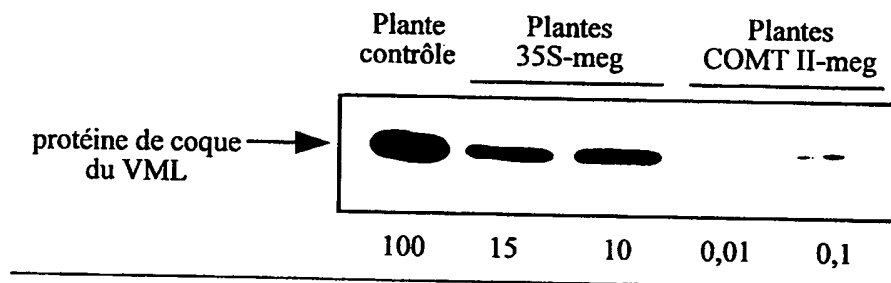
2/5

**Fig 2****Fig 3**

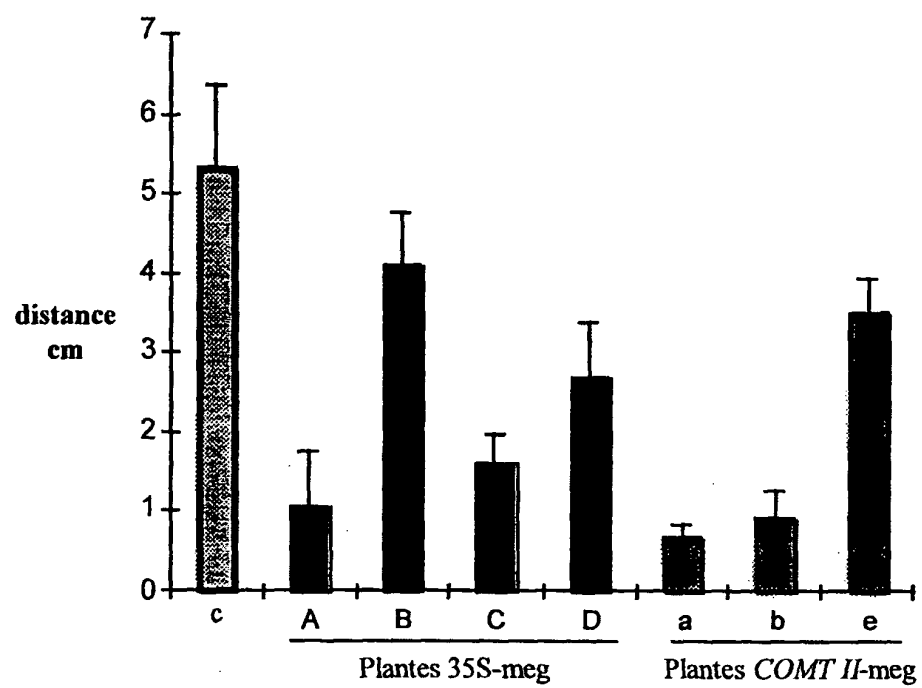
3/5

**Fig 4**

4/5

**Fig 5****Fig 6**

5/5

Fig 7

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHOBIO
- (B) RUE: 14-20 Rue Pierre BAIZET
- (C) VILLE: LYON
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 69009

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 26

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1863 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc signal
- (B) EMPLACEMENT:667..672
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite W inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc signal
- (B) EMPLACEMENT:820..830
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: enhancer
- (B) EMPLACEMENT:845..852

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc signal
- (B) EMPLACEMENT:1034..1047
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite P"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc signal
- (B) EMPLACEMENT:1221..1226
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite G"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc signal
- (B) EMPLACEMENT:1343..1356
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L inverse"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc signal

- (B) EMPLACEMENT:1369..1374
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite A"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: misc_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1377..1382
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: misc_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1483..1488
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite GT"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: misc_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1562..1567
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite W inverse"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: misc_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1600..1614
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite L"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: CAAT_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1675..1679
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: misc_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1681..1690
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/function= "boite E"
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: CAAT_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1695..1699
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: TATA_signal
 - (B) EMPLACEMENT:1735..1739
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: transcription origin
 - (B) EMPLACEMENT:1772

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA	60
AAAAGAACAG CATTTTAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTCATT GTATCTAGAA	120
AGAAATTGAA AAAAGAAATA TTCTATTTCA CTATTATGTT AGGTGCAACT ATATCATCAC	180
CATGGAAAAG CCGGAGTAAA AAGAGAACGT AGAGGAGATT TCATGATTTG ATTGAGAATA	240
TAATATATTA TTTTTTTGTA ATTCCACACA AAGATTAAGA AAATGATCTG ATCAATGATG	300
GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGGGAATA TGACATTAAT ATAAATTTGT CGCTGCCTAT	360
AAAGACCCTA TCTATCTATC TATCTATCTA TATATATATA TATATATATA TATATATATA	420
TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATAAG CGCTAATATT TGATTATTTT	480
TTAAAAATAT TTATAAGTAT ATATGAAATT TTTGACGAAA TTTTGTGTG ACCGTGACCC	540
CTCAACCTAT AGTGTGCGTC CACCTGTGCC AACAATATAG AGACAATTTG CTCGTATAGT	600

CAGAAAGAGT	GTTTTACTTT	TTAGTTGCTT	TTTAGTGAAT	CTACTCGGTA	TAAAGTTAAA	660
TTAGTGGGTC	AATAAGTCGG	GTGAATAGTT	AAAGAAAACA	GTGGTGAGTT	TAGCTGTCAA	720
ATAATTTCTT	CTTTTTCTTG	TTTTCACATT	AGAAATCAAA	ATAAAACACA	AGCTTTTTGT	780
ATTTATTTTA	ACACAAGCTA	ATTATATGTT	TATATGCTGG	TTAGGTGAAG	TAAAGCATGT	840
TATATGAGGA	AAGTACGAAG	AAAATGTGCC	AATTGTCTGT	TACAGCAAAG	CAGCCAGCAC	900
AAGCAAATTC	GCACTTGATA	AGTGGCTAAG	TCCACTTTCT	AGTGGACCTA	GTGGTTCACT	960
AACCTTTACC	AAAAAGGCAA	TAATTTGCAA	TTCAAAAAGA	AAAAAGGAAA	AAAGAAAAC	1020
AGACAGACTT	TAACACACCA	ACTCCCACAG	GAAGCAACAA	TGCAACTCAC	AAAAGGAAAC	1080
CGAGTTTTTC	CGCGACGGAT	CTAGAATTTG	GGTTCATTCT	TTACGCTTTT	TCGTATTAAA	1140
CTCATTATAT	TTGTATAATT	ATGGGTTTAT	ATTTTTTATT	TATTGTAATT	TTTGTAATAA	1200
TTTATATATA	AGTGTATACT	CCACGTCTCC	GGATACTACA	TTAGCCTCTA	GGGTTCTTAA	1260
TACTCTTGTT	AAATTGTCCA	GGCTCCAAAC	GCATGTTCGT	TTCAATTTTA	ACGGATGTTT	1320
CCGAACAAC	CCAAATGTTC	AATGTTAGGT	GTGTTTGGTG	TTAAGCTTCC	GTCCTAGGTT	1380
AATAGAATAG	ATAATTGTTG	TTTCTTATAT	AGTTTTGAAC	AATCGTCGCC	ATAAACTAAT	1440
TTTTAGGATG	GAAGCTAATT	TTTAGGATGG	AGTACAGCCT	AAGGTTAAAA	TATAACTATA	1500
AAAAATATCC	ATAAAAGGTG	AAATTTAATT	AGTAACATGA	AAAGATAAAA	CTAGTGTTAT	1560
CGGTCAAAC	TTCAAAAGAG	AAAGAAATAA	CTAGACAAAC	TTCAACAACC	AACCTGCCCCA	1620
ACATGCTACT	GTGCAATTGA	AAAATAAACA	AAAGAGAACC	AGACAATATT	TCAACCAATA	1680
TTCCATCAAG	AAAACCAATT	ATGACAATTC	TTAACCAAAG	TCACAACATA	CACCTATAAA	1740
AAGCACTAAC	TCAACTGTAC	ATGATTGTGA	AGCCTAACAA	AAACACTCTA	AAAGGAAAAA	1800
ACTACGAGAA	TAATTACACT	ACAACCTCTA	TAGCTAATTC	TTGTCTCAAG	ATTTTCAGCT	1860
ATG						1863

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5371 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: promoteur
- (B) EMBLEMMENT:1..1860

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: transcription origine
- (B) EMBLEMMENT:1772

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT:1861..2281

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: intron

(B) EMPLACEMENT:2282..3633

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT:3634..3944

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: intron

(B) EMPLACEMENT:3945..4726

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: exon

(B) EMPLACEMENT:4727..5089

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: terminateur

(B) EMPLACEMENT:5090..5371

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AAAGTTAGGG ACAATCTATA GTGTCACAAA GTTGCTTATG GCTTTTGGTT CAGATAAAGA	60
AAAAGAACAG CATTTTAAATT TGTGAAGATT AGTCTGAGCA GAATTCATT GTATCTAGAA	120
AGAAATTGAA AAAAGAAATA TTCTATTTCA CTATTATGTT AGGTGCAACT ATATCATCAC	180
CATGGAAAAG CCGGAGTAAA AAGAGAACGT AGAGGAGATT TCATGATTG ATTGAGAATA	240
TAATATATTA TTTTTTTGTA ATTCCACACA AAGATTAAGA AAATGATCTG ATCAATGATG	300
GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGGGAAC TAACATTAAT ATAAATTGT CGCTGCCTAT	360
AAAGACCCTA TCTATCTATC TATCTATCTA TATATATATA TATATATATA TATATATATA	420
TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATAAG CGCTAATATT TGATTATTTT	480
TTAAAAATAT TTATAAGTAT ATATGAAATT TTTGACGAAA TTTTGTGTG ACCGTGACCC	540
CTCAACCTAT AGTGTGCGTC CACCTGTGCC AACAATATAG AGACAATTG CTCGTATAGT	600
CAGAAAGAGT GTTTTACTTT TTAGTTGCTT TTTAGTGAAT CTA CTGCTGTA TAAAGTTAAA	660
TTAGTGGGTC AATAAGTCGG GTGAATAGTT AAAGAAAACA GTGGTGAGTT TAGCTGTCAA	720
ATAATTTCTT CTTTTCTTG TTTTCACATT AGAAATCAAA ATAAACACA AGCTTTTTGT	780
ATTTATTTTA ACACAAGCTA ATTATATGTT TATATGCTGG TTAGGTGAAG TAAAGCATGT	840
TATATGAGGA AAGTACGAAG AAAATGTGCC AATTGTCGTG TACAGCAAAG CAGCCAGCAC	900
AAGCAAATTC GCACTTGATA AGTGGCTAAG TCCACTTTCT AGTGGACCTA GTGGTTCCT	960
AACTTTTACC AAAAAGGCAA TAATTTGCAA TTCAAAAAGA AAAAAGGAAA AAAGAAAAC	1020
AGACAGACTT TAACACACCA ACTCCACAG GAAGCAACAA TGCAACTCAC AAAAGGAAAC	1080
CGAGTTTTTC CGCGACGGAT CTAGAATTG GGTTCATTCT TTACGCTTTT TCGTATTAAA	1140
CTCATTATAT TTGTATAATT ATGGGTTTAT ATTTTTTATT TATTGTAATT TTTGTAAAAT	1200
TTTATATATA AGTGTATACT CCACGTCTCC GGATACTACA TTAGCCTCTA GGGTCTTAA	1260

TACTCTTGTT	AAATTGTCCA	GGCTCCAAAC	GCATGTTTCGT	TTCAATTTTA	ACGGATGTTT	1320
CCGAACAACT	CCAAATGTTC	AATGTTAGGT	GTGTTTGGTG	TTAAGCTTCC	GTCCTAGGTT	1380
AATAGAATAG	ATAATTGTTG	TTTCTTATAT	AGTTTTGAAC	AATCGTCGCC	ATAAACTAAT	1440
TTTTAGGATG	GAAGCTAATT	TTTAGGATGG	AGTACAGCCT	AAGGTTAAAA	TATAACTATA	1500
AAAAATATCC	ATAAAAGGTG	AAATTTAATT	AGTAACATGA	AAAGATAAAA	CTAGTGTTAT	1560
CGGTCAAAC	TTCAAAAGAG	AAAGAAATAA	CTAGACAAAC	TTCAACAACC	AACCTGCCCCA	1620
ACATGCTACT	GTGCAATTGA	AAAATAAACA	AAAGAGAACC	AGACAATATT	TCAACCAATA	1680
TTCCATCAAG	AAAACCAATT	ATGACAATTC	TTAACCAAAG	TCACAACTAA	CACTTATAAA	1740
AAGCACTAAC	TCAACTGTAC	ATGATTGTGA	AGCCTAACAA	AAACACTCTA	AAAGGAAAAG	1800
ACTACGAGAA	TAATTACACT	ACAACTCTTA	TAGCTAATTC	TTGTCTCAAG	ATTTTCAGCT	1860
ATGGAATCCT	CAACCAAAAG	CCAAATACCA	ACACAATCAG	AAGAAGAGCG	TAAGTGCACA	1920
TATGCCATGC	AACTATTGTC	ATCTTCAGTC	CTCCCCTTTG	TGTTGCATTC	AACAATTCAA	1980
TTGGAAGTTT	TTGAGATATT	AGCCAAATCT	AATGACACTA	AACTTTCTGC	TTCTCAAATT	2040
GTTCCTCAA	TTCTTAAC	CTGCTTAA	CTATGTTAAA	TAGGATGCTT		2100
TATGTCTTGG	CTAGTTACTC	CTTGTTTACT	TGTTCCATTG	TTGAAGATGA	AAAAAATAAT	2160
GGGGGCCAAA	AAAGAGTGTA	TGGTTTGTCA	CAAGTGGGAA	AATTCTTTGT	TAAAAATGAA	2220
AATGGTGCAT	CAATGGGGCC	ACTTTTGGCT	TTGCTTCAAA	ATAAAGTATT	CATAAACAGC	2280
TGGTAAGTTT	TGTCTACTG	TGTATTCTTT	TTGCAGTGGC	TGTATTGATT	GGTTGCCTTT	2340
TTCAACAAG	AAGATTCTTA	AGTTTTATTA	CTTGTCGATT	TATGTTAGTC	GTATGTGCTA	2400
GTGTTATTAT	TCTCCATCTG	ATCCTTTTAT	TGGTCACTTT	ACCTAAAAAT	ATTGTTACAA	2460
AACATTTGTC	CTTCTAGAAA	ATCAGGTATT	ATTAATTTTT	CAATTCCATC	TTTATTACTC	2520
CAATAGTGAA	TATGGTTATT	AATTAGTGTT	TTAAGGAAGA	TGTAAGGATA	ATTTAATCAA	2580
ATAGGATTTA	TTATTAATGT	TGTCAAAGAT	TCTGGTGGAT	GGATCGGAGA	AAATTTCTTC	2640
ATCTTAATCA	GAGTTTGATG	TTCGAGCCAC	AGGAATGAAT	TTGTTTTTAA	TAGGGAGTAT	2700
TTTCTCTTTG	AATAGACCTT	ACACAATAAA	AGGACAACCC	GGTACACTAA	GCTTCCGTTA	2760
TGCGCGGGGT	TCGGGGAAAG	GACCGCATCA	CCAGGTCTAT	TGTACGCAGC	GTTACCCAAC	2820
GTGAATCTAA	ATTAATGAGA	CTAAAAAATG	GAACCCAACA	CCAGTGAAAA	CCAAAAAAG	2880
AAGCAAACCT	TAGTGGATGG	CTTGGAAGA	TCTTTCTTCT	TGAATAACTT	GGAGCGCTAT	2940
ATATTAAGGC	GTCGCAGCCG	TTAGATACTT	TCAAGAAGAA	AGCTAAAAAA	TGTTTTAAAG	3000
TTACGGCGCT	AGAATAATGA	AATTTCTCTA	TATATATAAT	TCAAAAGTTA	ATAATTTATT	3060
CTCTTAACCT	AAATCTATAT	TATAAAACTA	TATTAAGTAA	CTTCTGCCTA	ATTTATAATA	3120
TACAACCTAAT	GTTTTGAGAA	AACAAAATAA	CAACAACATC	AAACCCAATG	AAATCCCACA	3180
AGTAGAGTTT	GGGGAGGATA	GTGTGTACGG	AGACCTTACC	CCTACCTTAT	AAAGTTAAAG	3240

AGGCTGTTTT CGAAGACTC TCGGCTCAAG AACATTAAAA ATTTGAGAAA ACAAATATA 3300
AATTCAAAAC CTATATTAAG TTTATAATCC ATGGTATATT ATATTGGCTT AGTAATCTGA 3360
AATGAAAGAT TTATGTTTGA CTCCTCTAAA CTTGTTTTTA ATGCAAAAGA GGCACAACAT 3420
ATATATTATA AGTATCTTTT TTTGGTTTCC CACTGTGGCC GCTAAATTCG GATTGCTGG 3480
AAGTGTCACT TTGTTGGAGA TGGGGGCAAC GCTCACAACA AAGACGATTC TATAATTAGT 3540
GTTGGAACCT GAAATTTTAG TTAAAGATAA AGAAGTACTT ACCATAATGG TAGATATGAT 3600
CATATCTGAC TCTCTTTCTA ATTTCAAATT ACAGGTTTGA ACTAAAAGAT GCAGTTCTTG 3660
AAGGAGGAGT TCCATTTGAC AGGGTACACG GTGTGCATGC ATTTGAATAT CCAAATCGG 3720
ACCCAAAATT CAATGATGTT TTCAACAAGG CAATGATCAA TCACACAACCT GTAGTCATGA 3780
AAAAAATACT TGAAAATTAC AAAGGTTTTG AGAACCTTAA AACTTTGGTT GATGTTGGAG 3840
GTGGTCTTGG AGTTAACCTC AAGATGATTA CATCTAAATA CCCCACAATT AAGGGCATA 3900
ATTTTGATTT GCCACATGTT GTTCAACATG CCCCTTCCTA TCCTGGTACC TTCTCTCGTT 3960
CTTATTTTGT TGTTTATTAT ATTTACTTCG ATCATCAGGT CTAGGTCTGT CAAGTTAAAT 4020
TCGTTCTCAA AAAAGTTTAT AAAGGTTTTG AACTCCATCA CCTATTGCTT TAGGATTTTG 4080
AGTTGTATGC TCTGAGTCTT GCGCATGGTA TCATAGTCAA TTTATTTAAG CTCGTTATTG 4140
CACTTGTGAA TTCTATTATA TAAGGAGTAA GCCTACCAA AAGGAGCGAA AATATTTTCC 4200
AAAACCTTTT TTAAACCTTC CTCACCCCAT TCCCCTCTCC CCTCTCCCC AACACCACCC 4260
ACCACCCCAA CTCCCCCGTC TTAGTTTTTT TATTTATCCT GGACTTTCTT ATATTTTATG 4320
CTTTCCTTTA ATTGAACCTC TGTAATAAAA CCATTTGCCC CCCACCCTAT AGTGTTTGCC 4380
TAAATTTTAT ATTTTTCAAA ATAATATTTT CTATTTACTA ATTAAACATT AGAAAATATT 4440
TTTCGGATTT TTTTCCACTC ACCAACCAAG CATGGGAAAA TAGTGATAAA ACTACTCATT 4500
TTTCAAAATA ATATTTTCAA GGAAAACATT TTCCTTTATA CCAAATACCC TTAATCTTGT 4560
ATACAAATCT TCATGTCGAT GATCTTGCAA TATATATACA TGTATATGTA TGATTTGATA 4620
AACCACATGA ACAAATGGT TGAGCTCTGC GAATTGTGAT ATATGATTTG CTTATGTGTT 4680
GTGCACTATC AATTACTTAA ATTAACTTC ATCTAATAAT ATTGCAGGGG TGGAACATGT 4740
TGGGGGAGAT ATGTTTGAAA GTGTTCCAGA AGGAGATGCT ATTTTATGA AGTGGATTCT 4800
TCATGACTGG AGTGATAGTC ACAACCTCAA GTTGCTAAAG AACTGCTACA AGGCTCTACC 4860
AGACAATGGA AAGGTGATTG TTGTTGAGGC CATTTTACCA GTGAAACCAG ACATTGACAC 4920
CGCAGTGGTT GGCCTTTCGC AATGTGATTT GATCATGATG GCTCAAAATC CTGGAGGCAA 4980
AGAGCGATCG GAAGAGGAGT TTCGAGCCTT GGCTACTGAA GCTGGATTCA AAGGCGTTAA 5040
CTTAATATGT TGTGTCTGTA ATTTTGGGT CATGGAATTC TGCAAGTAGA TTTCTACTGT 5100
ACATTGAGTT TCTACTACTC TTGAGTATCC ATTTATGGCA ATCTGGGACT GGAATTGCAG 5160
CTTAGTCCAG ATTGAACATT GATATTCCTA ATAATATTTT TATTATTTCC CTTGTTTATT 5220

TCTCTTGAT GAAAGGATGT CATTTTGAGT ATTGATAATC ATGTTCTCTA GGACAGAAAT 5280
 TGTAACCTTG TCCAACCTTA TTGATATTCC TAGTAAGATT TATATGACAT GTGTCTCTGG 5340
 TTTGAGAAGA GTTTCAATAT CTACAGACGG G 5371

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1095 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMBLACEMENT: 1..1095

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG GAA TCC TCA ACC AAA AGC CAA ATA CCA ACA CAA TCA GAA GAA GAG	48
Met Glu Ser Ser Thr Lys Ser Gln Ile Pro Thr Gln Ser Glu Glu Glu	
1 5 10 15	
CGT AAC TGC ACA TAT GCC ATG CAA CTA TTG TCA TCT TCA GTC CTC CCC	96
Arg Asn Cys Thr Tyr Ala Met Gln Leu Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro	
20 25 30	
TTT GTG TTG CAT TCA ACA ATT CAA TTG GAA GTT TTT GAG ATA TTA GCC	144
Phe Val Leu His Ser Thr Ile Gln Leu Glu Val Phe Glu Ile Leu Ala	
35 40 45	
AAA TCT AAT GAC ACT AAA CTT TCT GCT TCT CAA ATT GTT TCT CAA ATT	192
Lys Ser Asn Asp Thr Lys Leu Ser Ala Ser Gln Ile Val Ser Gln Ile	
50 55 60	
CCT AAC TGC ACA AAA CCT GAA GCA CCT ACT ATG TTA AAT AGG ATG CTT	240
Pro Asn Cys Thr Lys Pro Glu Ala Pro Thr Met Leu Asn Arg Met Leu	
65 70 75 80	
TAT GTC TTG GCT AGT TAC TCC TTG TTT ACT TGT TCC ATT GTT GAA GAT	288
Tyr Val Leu Ala Ser Tyr Ser Leu Phe Thr Cys Ser Ile Val Glu Asp	
85 90 95	
GAA AAA AAT AAT GGG GGC CAA AAA AGA GTG TAT GGT TTG TCA CAA GTG	336
Glu Lys Asn Asn Gly Gly Gln Lys Arg Val Tyr Gly Leu Ser Gln Val	
100 105 110	
GGA AAA TTC TTT GTT AAA AAT GAA AAT GGT GCA TCA ATG GGG CCA CTT	384
Gly Lys Phe Phe Val Lys Asn Glu Asn Gly Ala Ser Met Gly Pro Leu	
115 120 125	
TTG GCT TTG CTT CAA AAT AAA GTA TTC ATA AAC AGC TGG TTT GAA CTA	432
Leu Ala Leu Leu Gln Asn Lys Val Phe Ile Asn Ser Trp Phe Glu Leu	
130 135 140	
AAA GAT GCA GTT CTT GAA GGA GGA GTT CCA TTT GAC AGG GTA CAC GGT	480
Lys Asp Ala Val Leu Glu Gly Gly Val Pro Phe Asp Arg Val His Gly	
145 150 155 160	
GTG CAT GCA TTT GAA TAT CCA AAA TCG GAC CCA AAA TTC AAT GAT GTT	528
Val His Ala Phe Glu Tyr Pro Lys Ser Asp Pro Lys Phe Asn Asp Val	
165 170 175	

TTC AAC AAG GCA ATG ATC AAT CAC ACA ACT GTA GTC ATG AAA AAA ATA	576
Phe Asn Lys Ala Met Ile Asn His Thr Val Val Met Lys Lys Ile	
180 185 190	
CTT GAA AAT TAC AAA GGT TTT GAG AAC CTT AAA ACT TTG GTT GAT GTT	624
Leu Glu Asn Tyr Lys Gly Phe Glu Asn Leu Lys Thr Leu Val Asp Val	
195 200 205	
GGA GGT GGT CTT GGA GTT AAC CTC AAG ATG ATT ACA TCT AAA TAC CCC	672
Gly Gly Gly Leu Gly Val Asn Leu Lys Met Ile Thr Ser Lys Tyr Pro	
210 215 220	
ACA ATT AAG GGC ACT AAT TTT GAT TTG CCA CAT GTT GTT CAA CAT GCC	720
Thr Ile Lys Gly Thr Asn Phe Asp Leu Pro His Val Val Gln His Ala	
225 230 235 240	
CCT TCC TAT CCT GGG GTG GAA CAT GTT GGG GGA GAT ATG TTT GAA AGT	768
Pro Ser Tyr Pro Gly Val Glu His Val Gly Gly Asp Met Phe Glu Ser	
245 250 255	
GTT CCA GAA GGA GAT GCT ATT TTT ATG AAG TGG ATT CTT CAT GAC TGG	816
Val Pro Glu Gly Asp Ala Ile Phe Met Lys Trp Ile Leu His Asp Trp	
260 265 270	
AGT GAT AGT CAC AAC CTC AAG TTG CTA AAG AAC TGC TAC AAG GCT CTA	864
Ser Asp Ser His Asn Leu Lys Leu Leu Lys Asn Cys Tyr Lys Ala Leu	
275 280 285	
CCA GAC AAT GGA AAG GTG ATT GTT GTT GAG GCC ATT TTA CCA GTG AAA	912
Pro Asp Asn Gly Lys Val Ile Val Val Glu Ala Ile Leu Pro Val Lys	
290 295 300	
CCA GAC ATT GAC ACC GCA GTG GTT GGC GTT TCG CAA TGT GAT TTG ATC	960
Pro Asp Ile Asp Thr Ala Val Val Gly Val Ser Gln Cys Asp Leu Ile	
305 310 315 320	
ATG ATG GCT CAA AAT CCT GGA GGC AAA GAG CGA TCG GAA GAG GAG TTT	1008
Met Met Ala Gln Asn Pro Gly Gly Lys Glu Arg Ser Glu Glu Glu Phe	
325 330 335	
CGA GCC TTG GCT ACT GAA GCT GGA TTC AAA GGC GTT AAC TTA ATA TGT	1056
Arg Ala Leu Ala Thr Glu Ala Gly Phe Lys Gly Val Asn Leu Ile Cys	
340 345 350	
TGT GTC TGT AAT TTT TGG GTC ATG GAA TTC TGC AAG TAG	1095
Cys Val Cys Asn Phe Trp Val Met Glu Phe Cys Lys	
355 360	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CGTTTCGCAA TGTGATTGA TC

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTCAAAATGA CATCCTTTCA TAC

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique n° 3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTGAAGATGT CAATAGTTGC ATGGC

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGTCTAGAGG GCCTTTTAGA GTGTTTTTGT TAG

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

AAAGTCGACC GTCCACCTGT GCCAACAAT

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TGTTTGGTGT TATGCTTCCG TCCT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 292 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AAAAAGCTTT TTAGGATGG AGTACAGCC

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

TTTAAGCTTA AAGAGAACCA GACAATATT

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 1..60
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= preproteine

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 61..60
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /function= preproteine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

atg aac ttc acc gct ctg ctc gct gcc gtc gcc gcc gcc ttg gtc gga	48
Met Asn Phe Thr Ala Leu Leu Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Val Gly	
1 5 10 15	
tct gcc aac gcc acc gcg tgc acc gcc acc cag cag acc gct gcg tac	96
Ser Ala Asn Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr	
20 25 30	
aag aca ctc gtg agc atc ctg tcg gac gcg tcg ttc aac aag tgc tct	144
Lys Thr Leu Val Ser Ile Leu Ser Asp Ala Ser Phe Asn Lys Cys Ser	
35 40 45	
acg gat tcg ggc tac tcc atg ctg acg gcc aag gcc ctc ccc acc acg	192
Thr Asp Ser Gly Tyr Ser Met Leu Thr Ala Lys Ala Leu Pro Thr Thr	
50 55 60	


```

gcg cag tac aag ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg atc 240
Ala Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met Ile
 65              70              75              80

aag aag atc gtg acg ctg aac ccg ccc aac tgc gac ctg acg gtg ccc 288
Lys Lys Ile Val Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asp Leu Thr Val Pro
      85              90              95

acg agc ggc ctg gtg ctc aac gtg tac tcg tac gcg aac ggc ttc tcg 336
Thr Ser Gly Leu Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Ala Asn Gly Phe Ser
      100              105              110

gac aag tgc tcg tcg ctg
Asp Lys Cys Ser Ser Leu 354
      115

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 354 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT: 1..294

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

```

acc gcg tgc acc gcc acc cag cag acc gct gcg tac aag aca ctc gtg 48
Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala Tyr Lys Thr Leu Val
 1              5              10              15

agc atc ctg tcg gac gcg tcg ttc aac aag tgc tct acg gat tcg ggc 96
Ser Ile Leu Ser Asp Ala Ser Phe Asn Lys Cys Ser Thr Asp Ser Gly
      20              25              30

tac tcc atg ctg acg gcc aag gcc ctc ccc acc acg gcg cag tac aag 144
Tyr Ser Met Leu Thr Ala Lys Ala Leu Pro Thr Thr Ala Gln Tyr Lys
      35              40              45

ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg atc aag aag atc gtg 192
Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met Ile Lys Lys Ile Val
      50              55              60

acg ctg aac ccg ccc aac tgc gac ctg acg gtg ccc acg agc ggc ctg 240
Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asp Leu Thr Val Pro Thr Ser Gly Leu
      65              70              75              80

gtg ctc aac gtg tac tcg tac gcg aac ggc ttc tcg gac aag tgc tcg 288
Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Ala Asn Gly Phe Ser Asp Lys Cys Ser
      85              90              95

tcg ctg
Ser Leu 294

```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1620 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: promoteur COMTII

(B) EMPLACEMENT:1..1263

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS Mégaspermine

(B) EMPLACEMENT:1264..1630

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

```

cgtccacctg tgccaacaat atagagacaa tttgctcgta tagtcagaaa gagtggtttta 60
cttttttagtt gctttttagt gaatctactc ggtataaagt taaatttagtg ggtcaataag 120
tcgggtgaat agttaaagaa aacagtggtg agtttagctg tcaaataatt tcttcttttt 180
cttggttttca cattagaaat caaaataaaa cacaagcttt ttgtatttat tttaacacaa 240
gctaattata tgtttatatg ctggttaggt gaagtaaagc atgttatatg aggaaagtac 300
gaagaaaatg tgccaattgt cgtgtacagc aaagcagcca gcacaagcaa attcgcactt 360
gataagtggc taagtccact ttctagtggg cctagtgggt cactaacttt taccaaaaag 420
gcaataatth gcaattcaaa aagaaaaaag gaaaaaagaa aactagacag actttaacac 480
accaactccc acaggaagca acaatgcaac tcacaaaagg aaaccgagtt tttccgcgac 540
ggatctagaa tttgggttca ttctttacgc tttttcgtat taaactcatt atatttgtat 600
aattatgggt ttatatthtt tattttattgt aatttttgta aaattttata tataagtgtat 660
tactccacgt ctccggatac tacattagcc tctaggggtc ttaatactct tgttaaattg 720
tccaggctcc aaacgcatgt tcgtttcaat tttaacggat gtttccgaac aactccaaat 780
gttcaatggt aggtgtgttt ggtgttaagc ttccgtccta gggttaataga atagataatt 840
gttgthttctt atatagthtt gaacaatcgt cgccataaac taattthttag gatggaagct 900
aattthttagg atggagtaca gcctaagggt aaaatataac tataaaaaat atccataaaa 960
ggtgaaatth aattagtaac atgaaaagat aaaactagtg ttatcgggtc aactthtcaa 1020
agagaaagaa ataactagac aaacttcaac aaccaacctg cccaacatgc tactgtgcaa 1080
ttgaaaaata aacaaaagag aaccagacaa tatttcaacc aatattccat caagaaaacc 1140
aattatgaca attcttaacc aaagtcacaa ctaacactta taaaaagcac taactcaact 1200
gtacatgatt gtgaagccta acaaaaacac tctaaaaggc ctctagagga tccccggggt 1260

acc atg aac ttc acc gct ctg ctc gct gcc gtc gcc gcc gcc ttg gtc 1308
Met Asn Phe Thr Ala Leu Leu Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Val
1 5 10 15

gga tct gcc aac gcc acc gcg tgc acc gcc acc cag caa acc gct gcg 1356
Gly Ser Ala Asn Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gln Gln Thr Ala Ala
20 25 30

```


tac aaa aca ctc gtg agc atc ctg tgc gac gcg tcg ttc aac aag tgc 1404
 Tyr Lys Thr Leu Val Ser Ile Leu Ser Asp Ala Ser Phe Asn Lys Cys
 35 40 45

 tct acg gat tgc ggc tac tcc atg ctg acg gcc aag gcc ctc ccc acc 1452
 Ser Thr Asp Ser Gly Tyr Ser Met Leu Thr Ala Lys Ala Leu Pro Thr
 50 55 60

 acg gcg cag tac aag ctc atg tgc gcg tcc acg gca tgc aac acc atg 1500
 Thr Ala Gln Tyr Lys Leu Met Cys Ala Ser Thr Ala Cys Asn Thr Met
 65 70 75

 atc aaa aaa atc gtg acg ctg aac ccg ccc aac tgc aac ctg acg gtg 1548
 Ile Lys Lys Ile Val Thr Leu Asn Pro Pro Asn Cys Asn Leu Thr Val
 80 85 90 95

 ccc acg agc ggc ctg gtg ctc aac gtg tac tgc tac cca aac ggc ttc 1596
 Pro Thr Ser Gly Leu Val Leu Asn Val Tyr Ser Tyr Pro Asn Gly Phe
 100 105 110

 tcg gac aag tgc tgc tgc ctg taa 1620
 Ser Asp Lys Cys Ser Ser Leu
 115

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CGCGGATCCC CTTTAGAGT GTTTTGTTA GGC 33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

ACGCGTCGAC GTTAGGGACA ATCTATAGTG TCAC 33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS6

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

ACGCGTCGAC GCTCCGAGGA TTTGGCTGTC GCGG 34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS7

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

ACGCGTCGAC GCTGGTTAGG TGAAGTAAAG CATG

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS8

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

ACGCGTCGAC GCATGTTATA TGAGGAAAGT ACG

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS9

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

ACGCGTCGAC GCAGCCAGCA CAAGCAAATT CGC

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

ACGCGTCGAC GACTTTAACA CACCAACTCC C

31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS11

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

ACGCGTCGAC CGGATCTAGA ATTTGGGTTC ATTC

34

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS12

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

ACGCGTCGAC GTGTATACTC CACGTCTCCG GATAC

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS13

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

ACGCGTCGAC GTTCAATGTT AGGTGTGTTT GG

32

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PAS3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

CGCGGATCCG CTTAACACCA AACACACCTA ACATTG

36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Oligonucléotide synthétique PS14

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ACGCGTCGAC CAGTGGTGAG TTAGCTGTC

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/FR 00/00714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00 A01N63/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAPELLADES M ET AL: "THE MAIZE CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTER IS ACTIVE IN TRANSGENIC TOBACCO AND MAIZE PLANT TISSUES" PLANT MOLECULAR BIOLOGY,NL,NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412	1-11, 14, 15, 24-32
Y	the whole document ----- -/-	12, 13, 16-20



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PELLEGRINI, LUCA ET AL: "Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O- methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment" PLANT PHYSIOL. (1993), 103(2), 509-17, XP002124694 the whole document</p> <p>-& PELLEGRINI, L.: "N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase" EMBL ACCESSION NO:X71430, 23 November 1993 (1993-11-23), XP002124695 the whole document</p>	12,13
X	<p>WO 96 36697 A (UNIV PENNSYLVANIA) 21 November 1996 (1996-11-21)</p>	21,22, 24-32
Y	<p>example 15</p>	16-20,23
X	<p>KELLER, HARALD ET AL: "Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance" PLANT CELL (1999), 11(2), 223-235, February 1999 (1999-02), XP002124696 the whole document</p>	21,22, 24-32
Y		16-20,23
Y	<p>WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 February 1995 (1995-02-09) table 3</p>	23
X	<p>WO 99 09188 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ;BOERJAN WOUT (BE); CHEN CUIYING (BE) 25 February 1999 (1999-02-25) page 6 -page 9 page 17, line 5 - line 10</p>	1-11, 14-16, 24-32 17-20
Y		
X	<p>WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 March 1993 (1993-03-18) page 11, line 11 - line 24; figure 4</p>	1-11, 14-16, 24-32
X	<p>GRIMMIG, BERNHARD ET AL: "Structure of the parsley caffeoyl -CoA O- methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element" PLANT MOL. BIOL. (1997), 33(2), 323-341, XP002054325 the whole document</p>	1-11, 14-16, 24-32
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 23, 8 June 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, LEE, J. E. ET AL: "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)" XP002124705 abstract -& LEE, J.E., ET AL.: "Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds" EMBL ACCESSION NO:U54767, 23 August 1996 (1996-08-23), XP002124698 the whole document & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363, ---	1-11
X	CHEN, C.: "Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5" EMBL ACCESSION NO:AJ223620, 4 September 1998 (1998-09-04), XP002124699 the whole document ---	1
X	SASAKI, T., ET AL.: "Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03" EMBL ACCESSION NO: AB023482, 15 March 1999 (1999-03-15), XP002141362 see reverse complement of nts 44350-44495 ---	12
A	PANABIERES, F.: "P.cryptogea X24 gene for cryptogein" EMBL ACCESSION NO:Z34459, 1 December 1994 (1994-12-01), XP002124700 the whole document & PANABIERESS, F., ET AL.: "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitins, protein inducing a hypersensitive-like response in tobacco" MOL PLANT MICROBE INTERACT., vol. 8, 1995, pages 996-1003, -& PANABIERES, F.: "Beta-elcitin cryptogein precursor" SWISSPROT ACCESSION NO:P15570, 1 April 1990 (1990-04-01), XP002124701 the whole document ---	18-20
A	HUET, J.C., ET AL.: "Alpha-elcitin MGM-alpha" SWISSPROT ACCESSION NO:P35698, 1 June 1994 (1994-06-01), XP002124702 the whole document ---	19,20

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/EP 00/13292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08K5/5425 C08K5/54 C08L21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 43 19 142 A (HUELS) 15 December 1994 (1994-12-15) page 3, line 38 - line 65; claim 1	1
A	US 3 664 403 A (DORAN THOMAS J ET AL) 23 May 1972 (1972-05-23) claim 10	1, 22-27
A	EP 0 370 551 A (PCR) 30 May 1990 (1990-05-30) page 5, line 48 - line 56; claims	4-9

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2001

Date of mailing of the international search report

10/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mettler, R-M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern Application No

PCT/EP 00/13292

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4319142 A	15-12-1994	CA 2125469 A	10-12-1994
		DE 59408834 D	25-11-1999
		EP 0629653 A	21-12-1994
		ES 2139683 T	16-02-2000
		JP 7011013 A	13-01-1995
		US 5484848 A	16-01-1996
US 3664403 A	23-05-1972	US 3737334 A	05-06-1973
EP 0370551 A	30-05-1990	US 4975509 A	04-12-1990
		BR 8905854 A	12-06-1990
		CA 2001416 A,C	21-05-1990
		JP 2219838 A	03-09-1990
		US 5075351 A	24-12-1991

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema: Internationale No

PCT/EP 00/13292

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C08K5/5425 C08K5/54 C08L21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C08K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DE 43 19 142 A (HUELS) 15 décembre 1994 (1994-12-15) page 3, ligne 38 - ligne 65; revendication 1	1
A	US 3 664 403 A (DORAN THOMAS J ET AL) 23 mai 1972 (1972-05-23) revendication 10	1,22-27
A	EP 0 370 551 A (PCR) 30 mai 1990 (1990-05-30) page 5, ligne 48 - ligne 56; revendications	4-9

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 avril 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/05/2001

Nom et adresse postale de l'Administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mettler, R-M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/EP 00/13292

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 4319142	A	15-12-1994	CA 2125469 A	10-12-1994
			DE 59408834 D	25-11-1999
			EP 0629653 A	21-12-1994
			ES 2139683 T	16-02-2000
			JP 7011013 A	13-01-1995
			US 5484848 A	16-01-1996
US 3664403	A	23-05-1972	US 3737334 A	05-06-1973
EP 0370551	A	30-05-1990	US 4975509 A	04-12-1990
			BR 8905854 A	12-06-1990
			CA 2001416 A,C	21-05-1990
			JP 2219838 A	03-09-1990
			US 5075351 A	24-12-1991

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 juillet 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/49694 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C07F 7/18,
C08K 5/544, 5/5455

F-69005 Lyon (FR). MIGNANI, Gérard [FR/FR]; 2, avenue des Frères Lumière, F-69008 Lyon (FR). PARISOT, Hervé [FR/FR]; 538 Chemin de Wette-Fays, F-69300 Caluire (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/03666

(74) Mandataire: TROLLIET, Maurice; Rhodia Services, Direction de la Propriété Industrielle, Centre de Recherches de Lyon - BP 62, F-69192 Saint-Fons (FR).

(22) Date de dépôt international:
22 décembre 2000 (22.12.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99 16710 30 décembre 1999 (30.12.1999) FR
00 07701 16 juin 2000 (16.06.2000) FR

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): RHODIA CHIMIE [FR/FR]; 26, Quai Alphonse Le Gallo, F-92512 Boulogne Billancourt Cédex (FR).

(72) Inventeurs; et

Publiée:

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): BARRUEL, Pierre [FR/FR]; 11, Chemin des Aubépines, F-69160 Tassin La Demi-Lune (FR). BOURGEOIS, Elisabeth [FR/FR]; 281C Cours Emile Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). GUENNOUNI, Nathalie [FR/FR]; La Clairière, 5, rue de la Fondation Dorothee Petit, F-69540 Irigny (FR). LUCIANI, Pierre [FR/FR]; 35, rue de la Favorite,

— Avec rapport de recherche internationale.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: FUNCTIONALISED SILANE-BASED COMPOUNDS, METHODS FOR PRODUCING THEM AND THEIR USE IN THE AREA OF RUBBER MATERIALS

(54) Titre: COMPOSES A BASE DE SILANES FONCTIONNALISES, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LEUR UTILISATION DANS LE DOMAINE DES MATERIAUX EN CAOUTCHOUC

(57) Abstract: The invention relates first to compounds consisting essentially of a functionalised organosilane of formula $(R^1O)_a(R^2)_{3-a}SiZ$, wherein R^1 and R^2 are monovalent hydrocarbonated groups, a is a number chosen from 1, 2 and 3 and Z is a function containing an activated ethylenic double bond, chosen from the following: an ester-maleamic function and/or an ester-fumaramic function. The invention also relates to methods for producing said compounds, and to their use as white filler-elastomer coupling agents in rubber compositions containing a white filler, especially a siliceous white filler, as a reinforcing filler.

(57) Abrégé: La présente invention concerne, dans son premier objet, des composés constitués essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule $(R^1O)_a(R^2)_{3-a}SiZ$ où R^1 et R^2 sont des groupes hydrocarbonés monovalents ; a est un nombre choisi parmi 1, 2 et 3 ; et Z est une fonction comprenant une double liaison éthylénique activée choisie parmi une fonction ester-maléamique et/ou une fonction ester-fumaramique. Elle concerne aussi, dans un second objet, des procédés de préparation desdits composés. Elle concerne encore, dans un troisième objet, l'utilisation de pareils composés comme agents de couplage charge blanche - élastomère dans les compositions de caoutchouc comprenant une charge blanche, notamment siliceuse, à titre de charge renforçante.

WO 01/49694 A1

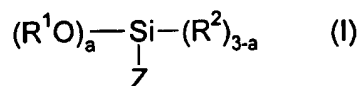
COMPOSES A BASE DE SILANES FONCTIONNALISES, LEUR PROCEDES DE PREPARATION ET
LEUR UTILISATION DANS LE DOMAINE DES MATERIAUX EN CAOUTCHOUC

5 La présente invention concerne de nouveaux composés à base de silanes fonctionnalisés, leurs procédés de préparation et leur utilisation comme agent de couplage charge blanche – élastomère dans les compositions de caoutchouc comprenant une charge blanche, notamment une matière siliceuse, à titre de charge renforçante.

10 Les composés à base de silanes fonctionnalisés, auxquels on s'intéresse dans le cadre du premier objet de l'invention, sont des composés constitués essentiellement d'organosilanes porteurs chacun d'une fonction ester-maléamique ou d'une fonction ester-fumaramique. Ces fonctions, qui comprennent une double liaison éthylénique activée par des groupes CO situés en α et β de la double liaison, confèrent aux composés organosilanes des propriétés spécifiques qui permettent de les utiliser
15 avantageusement comme agent de couplage charge-blanc-élastomère dans les compositions de caoutchouc comprenant une charge blanche à titre de charge renforçante.

Plus précisément, la présente invention vise dans son premier objet des composés constitués essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule :

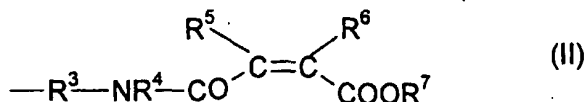
20



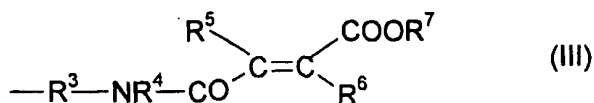
dans laquelle :

- les symboles R^1 identiques ou différents représentent chacun un groupe
25 hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 4 atomes de carbone ; un radical alkoxyalkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 2 à 6 atomes de carbone ; un radical cycloalkyle ayant de 5 à 8 atomes de carbone ; et un radical phényle ;
- les symboles R^2 identiques ou différents représentent chacun un groupe
30 hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; un radical cycloalkyle ayant de 5 à 8 atomes de carbone ; et un radical phényle ;

- Z est une fonction, comprenant une double liaison éthylénique activée, choisie parmi :
 - une fonction ester-maléamique Z² de formule :



- 5 ▪ et une fonction ester-fumaramique Z³ de formule :



formules dans lesquelles :

- + R³ est un radical hydrocarboné divalent alkylène, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 10 atomes de carbone, pouvant être interrompu par au moins un hétéroatome oxygéné, dont la valence libre portée par un atome de carbone est reliée à l'atome de Si ;
 - + les symboles R⁴, R⁵ et R⁶, identiques ou différents entre eux, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupe hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et un radical phényle ;
 - + R⁷ est un groupe hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et un radical phényle ;
 - a est un nombre choisi parmi 1, 2 et 3.
- Comme indiqué ci-avant, la présente invention, prise dans son premier objet, concerne des composés constitués essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I). L'expression "essentiellement" doit être interprétée comme signifiant que l'organosilane fonctionnalisé entrant dans le cadre de la présente invention peuvent se présenter sous forme d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I) à l'état pur ou sous forme d'un mélange de pareil organosilane avec une quantité molaire variable, généralement égale ou inférieure à 40 % molaire dans le mélange, d'autre(s) composé(s) organosilicique(s) comprenant :
- en quantité généralement égale ou inférieure à 10 % molaire : l'organosilane fonctionnalisé de formule (I) qui est l'isomère de l'organosilane, principalement obtenu, c'est-à-dire l'organosilane trans de formule (I) où Z est la fonction Z³ de

formule (III), quand l'organosilane principalement obtenu est l'organosilane cis de formule (I) où Z est la fonction Z² de formule (II) et inversement ; et/ou

- en quantité généralement égale ou inférieure à 30 % molaire : au moins un oligomère siloxane linéaire, cyclique et/ou en réseau formé de motifs répondant aux formules suivantes : (R⁸)₂ZSiO_{1/2} (IV-1), R⁸ZSiO_{2/2} (IV-2) et/ou ZSiO_{3/2} (IV-3), dans lesquelles : les symboles R⁸ identiques ou différents représentent chacun un radical monovalent choisi parmi le radical hydroxyle et/ou les radicaux répondant aux définitions de OR¹ et R² ; les symboles R¹, R² et Z sont tels que définis supra ; et le nombre total de motifs de formules (IV-1) à (IV-3), par molécule d'oligomère, est un nombre entier ou fractionnaire supérieur à 1, allant de préférence de 2 à une valeur inférieure à 3. La quantité molaire dont on parle ci-avant est exprimée en nombre d'atomes de Si (ou de motifs organosiliciques) appartenant à l' (aux) autre(s) composé(s) organosilicique(s) pour 100 atomes de Si présents dans le mélange total. A la connaissance de la Demanderesse, pareils oligomères siloxanes sont des produits nouveaux qui vont constituer un autre aspect de la présente invention prise dans son premier objet.

La quantité du (ou des) autre(s) composé(s) organosilicique(s) va varier essentiellement en fonction des conditions opératoires servant à la réalisation des procédés utilisables pour la préparation de l'organosilane fonctionnalisé de formule (I). Lorsque l'on est conduit à un mélange de produits, si l'on souhaite pouvoir disposer d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I) purifié ou à l'état pur, on procèdera à une purification, par exemple par distillation sous pression réduite ou par chromatographie en phase liquide.

Dans les formules précédentes, les radicaux R¹ préférés sont choisis parmi les radicaux : méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, n-butyle, CH₃OCH₂-, CH₃OCH₂CH₂-, CH₃OCH(CH₃)CH₂- ; de manière plus préférée, les radicaux R¹ sont choisis parmi les radicaux : méthyle, éthyle, n-propyle et isopropyle. Les radicaux R² préférés sont choisis parmi les radicaux : méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, n-butyle, n-pentyle, cyclohexyle et phényle ; de manière plus préférée, les radicaux R² sont des méthyles.

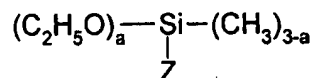
Les fonctions représentées par le symbole Z sont choisies de manière préférentielle parmi les fonctions de formules (II) et (III) dans lesquelles :

- le symbole R³ représente un reste alkylène qui répond aux formules suivantes : -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₄-, -CH₂-CH(CH₃)-, -(CH₂)₂-CH(CH₃)-(CH₂)-, -(CH₂)₃-O-(CH₂)₃-, -(CH₂)₃-O-CH₂-CH(CH₃)-CH₂- ; de manière plus préférée, R³ est un reste -(CH₂)₂- ou -(CH₂)₃- ;

4

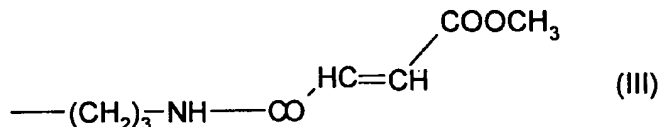
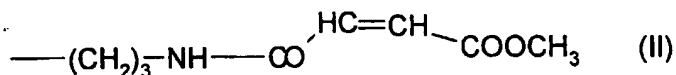
- les symboles R^4 , R^5 et R^6 sont choisis parmi : un atome d'hydrogène, et les radicaux méthyle ; éthyle, n-propyle, n-butyle ; de manière plus préférée, ces symboles sont choisis parmi un atome d'hydrogène et un radical méthyle ;
 - le symbole R^7 est choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle et isopropyle ;
- 5 de manière plus préférée R^7 est un méthyle.

Des organosilanes fonctionnalisés typiques répondant à la formule (I), sont ceux de formule :



où :

- 10 - a est un nombre égal à 2 ou 3,
- le symbole Z répond aux formules (II) et (III) suivantes :

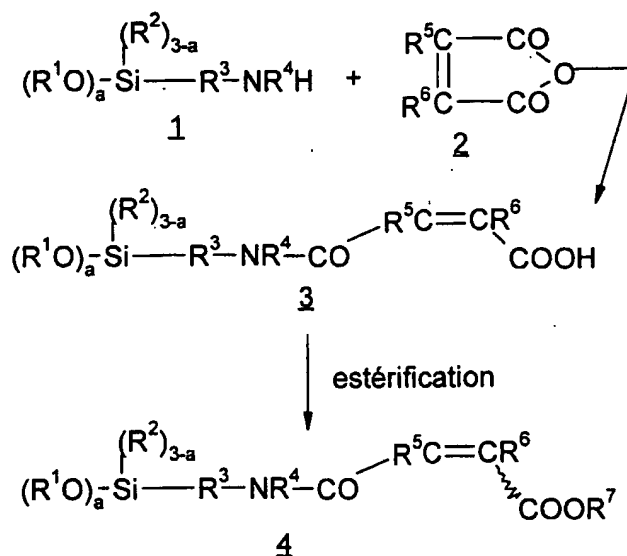


- 15 Les composés selon l'invention, constitués essentiellement d'organosilanes fonctionnalisés de formule (I) peuvent être préparés, et ceci constitue le second objet de la présente invention, en appliquant différents procédés de synthèse.

- Selon un premier procédé, les composés selon l'invention peuvent être préparés par estérification du dérivé acide maléamique intermédiaire en réalisant les étapes suivantes : (1) réaction de couplage entre un silane aminé 1 et l'anhydride maléique 2, puis (2) réaction d'estérification du dérivé de l'acide maléamique formé 3 pour conduire
- 20 au composé constitué essentiellement de l'organosilane fonctionnalisé souhaité 4, en appliquant le schéma de synthèse suivant :



5

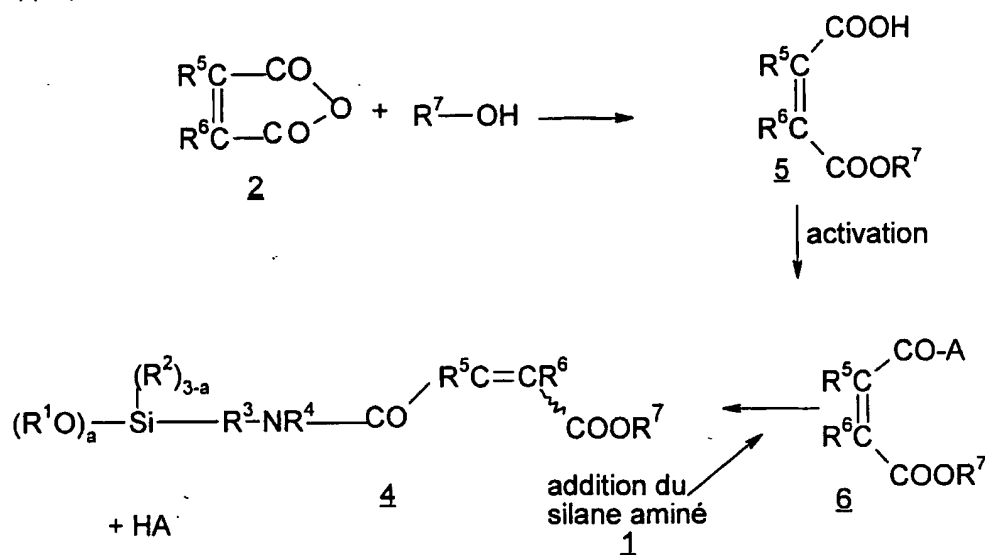


En ce qui concerne la manière pratique de mettre en œuvre les étapes (1) et (2), on se reportera pour plus de détails aux contenus des documents suivants qui décrivent, éventuellement au départ d'autres réactifs, des modes opératoires applicables à la

5 conduite des différentes étapes du procédé considéré :

- pour l'étape (1) : cf. notamment Izvestiya Akademii Nauk SSSR, 11, pages 2538-2543, 1970 ;
- pour l'étape (2) où plusieurs modes opératoires sont applicables :
 - (i) réaction du sel d'ammonium de l'acide carboxylique avec un agent comme le sulfate organique de formule $(R^7)_2\text{SO}_4$ ou l'iodure organique de formule $R^7\text{I}$:
 10 cf. notamment Can. J. Chem., 65, 1987, pages 2179-2181 et Tetrahedron Letters n°9, pages 689-692, 1973 ;
 - (2i) réaction du chlorure de l'acide carboxylique avec l'alcool de formule $R^7\text{OH}$ en présence d'une base aminée : cf. notamment Heterocycles, 39, 2, 1994,
 15 pages 767-778 et J. Org. Chem., 26, 1961, pages 697-700 ;
 - (3i) réaction de transestérification en présence d'un ester tel que le formiate de formule H-COOR^7 : cf. notamment Justus Liebigs Ann. Chem., 640, 1961, pages 142-144 et J. Chem. Soc., 1950, pages 3375-3377 ;
 - (4i) réaction de méthylation par le diazométhane qui permet de préparer aisément l'ester méthylique : cf. notamment Justus Liebigs Ann. Chem., 488, 1931,
 20 pages 211-227 ;
 - (5i) réaction d'estérification directe par l'alcool $R^7\text{-OH}$: cf. notamment Org. Syn. Coll., vol 1, pages 237 et 451, 1941 et J. Org. Chem., 52, 1987, page 4689.

Selon un second procédé, qui correspond à une voie de synthèse préférée, les composés selon l'invention peuvent être préparés par formation d'une fonction amide en additionnant un silane aminé 1 sur un dérivé ester activé 6 obtenu à partir d'un mono-ester de l'acide maléique 5, en réalisant les étapes suivantes : (1) alcoololyse de l'anhydride maléique 2 par l'alcool R^7-OH , (2) activation de la fonction acide carboxylique du mono-ester de l'acide maléique 5 obtenu, en utilisant les diverses méthodes d'activation décrites dans le domaine de la synthèse peptidique, pour conduire au dérivé ester activé 6, puis (3) addition du silane aminé 1 sur ledit dérivé ester activé 6 pour conduire au composé constitué essentiellement de l'organosilane fonctionnalisé souhaité 4, en appliquant le schéma de synthèse suivant :



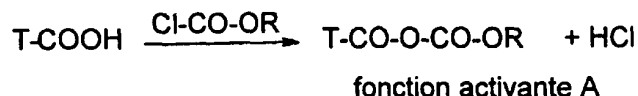
où le symbole A du dérivé 6 représente une fonction activante.

En ce qui concerne la manière pratique de mettre en œuvre les étapes (1) à (3), on se reportera pour plus de détails aux contenus des documents suivants qui décrivent, éventuellement au départ d'autres réactifs, des modes opératoires applicables à la conduite des différentes étapes du procédé considéré :

- pour l'étape (1) : cf. notamment J. Med. Chem., 1983, 26, pages 174-181 ;
- pour les étapes (2) et (3) : cf. John JONES, Amino Acid and Peptide-Synthesis, pages 25-41, Oxford University Press, 1994.

Afin de permettre l'addition de la fonction amine sur la fonction acide carboxylique du mono-ester de l'acide maléique 5, il convient au préalable de procéder à l'activation de ladite fonction acide carboxylique et cette activation peut se faire en particulier en mettant en œuvre les méthodes suivantes :

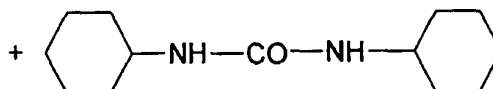
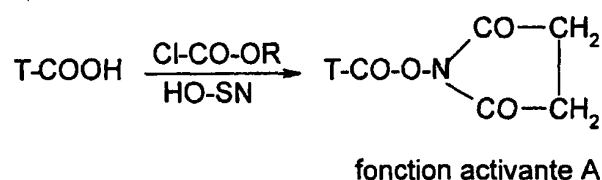
(j) activation par réaction avec un alkylchloroformiate, selon le schéma :



où T représente le reste $-\text{R}^5\text{C}=\text{CR}^6-\text{COOR}^7$ et R représente un radical alkyle linéaire ayant par exemple 1 à 3 atomes de carbone ;

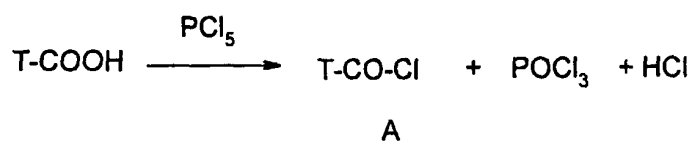
5

(2j) activation par réaction avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) en présence de préférence de N-hydroxysuccinimide (HO-SN), selon le schéma :



10

(3j) activation par réaction avec un composé chloré comme par exemple le chlorure de thionyle, le pentachlorure de phosphore, selon le schéma :



Les méthodes d'activation (j) et (2j) sont spécialement préférées.

Comme exemples concrets d'organoaminosilanes 1 peuvent être cités ceux de formules données ci-après :

- 15 $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{CH}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
 $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
 $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CH}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
- 20 $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
 $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CH}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{NH}_2$
 $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Selon le troisième de ses objets, la présente invention concerne encore l'utilisation d'une quantité efficace d'au moins un composé constitué essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I) comme agent de couplage charge blanche-élastomère dans les compositions d'élastomère(s) de type caoutchouc, naturel(s) ou
5 synthétique(s), comprenant une charge blanche, notamment une matière siliceuse, à titre de charge renforçante, qui sont destinées à la fabrication d'articles en élastomère(s).

Les types d'articles en élastomère(s), où l'invention est la plus utile, sont ceux sujets notamment aux contraintes suivantes : des variations de températures et/ou des variations de sollicitation de fréquence importante en régime dynamique ; et/ou une
10 contrainte statique importante ; et/ou une fatigue en flexion importante en régime dynamique. Des types d'articles sont par exemple : des bandes de convoyeur, des courroies de transmission de puissance, des tuyaux flexibles, des joints de dilatation, des joints d'appareils électroménagers, des supports jouant le rôle d'extracteurs de vibrations de moteurs soit avec des armatures métalliques, soit avec un fluide hydraulique à
15 l'intérieur de l'élastomère, des câbles, des gaines de câbles, des semelles de chaussures et des galets pour téléphériques.

Le domaine de l'invention est celui d'une utilisation performante capable de procurer des compositions d'élastomère(s) qui présentent notamment : pour une grande facilité de mise en oeuvre des mélanges crus préparés, en particulier au niveau des
20 opérations d'extrusion et de calandrage, des propriétés rhéologiques marquées par des valeurs de viscosité les plus faibles possibles ; pour atteindre une excellente productivité de l'installation de vulcanisation, des temps de vulcanisation les plus courts possibles ; et pour répondre aux contraintes d'utilisations dont on a parlé ci-avant, d'excellentes propriétés de renforcement conférées par une charge, en particulier des valeurs
25 optimales de module d'élasticité en traction, de résistance à la rupture en traction et de résistance à l'abrasion.

Pour atteindre un tel objectif, de nombreuses solutions ont été proposées qui se sont essentiellement concentrées sur l'utilisation d'élastomère(s) modifiés avec une charge blanche, notamment de la silice, comme charge renforçante. On sait, d'une
30 manière générale, que pour obtenir les propriétés de renforcement optimales conférées par une charge, il convient que cette dernière soit présente dans la matrice élastomère sous une forme finale qui soit à la fois la plus finement divisée possible et répartie de la façon la plus homogène possible. Or, de telles conditions ne peuvent être réalisées que dans la mesure où la charge présente une très bonne aptitude d'une part à s'incorporer
35 dans la matrice lors du mélange avec le (ou les) élastomère(s) et à se désagglomérer, et à d'autre part à se disperser de façon homogène dans la matrice élastomère. L'usage de charge blanche renforçante siliceuse, notamment de silice renforçante siliceuse, s'est révélé

inapproprié en raison du faible niveau de certaines propriétés de telles compositions et par voie de conséquence de certaines propriétés des articles mettant en oeuvre ces compositions.

Pour des raisons d'affinités réciproques, les particules de charge blanche, notamment de silice, ont une fâcheuse tendance, dans la matrice élastomère, à s'agglomérer entre elles. Ces interactions charge/charge ont pour conséquence néfaste de limiter les propriétés de renforcement à un niveau sensiblement inférieur à celui qu'il serait théoriquement possible d'atteindre si toutes les liaisons charge blanche-élastomère susceptibles d'être créées pendant l'opération de mélange, étaient effectivement obtenues.

De surcroît, l'usage de la charge blanche soulève des difficultés de mise en oeuvre dues aux interactions charge/charge qui tendent à l'état cru à augmenter la viscosité des compositions élastomères, en tout cas à rendre la mise en oeuvre plus difficile.

Il est connu de l'homme de l'art qu'il est nécessaire d'utiliser un agent de couplage encore appelé agent de liaison, qui a pour fonction d'assurer la connexion entre la surface des particules de charge blanche et l'élastomère, tout en facilitant la dispersion de cette charge blanche au sein de la matrice élastomérique.

Par agent de "couplage" (charge blanche-élastomère), on entend de manière connue un agent apte à établir une connexion suffisante, de nature chimique et/ou physique, entre la charge blanche et l'élastomère ; un tel agent de couplage, au moins bifonctionnel, a par exemple comme formule générale simplifiée "Y-B-X", dans laquelle :

- Y représente un groupe fonctionnel (fonction "Y") qui est capable de se lier physiquement et/ou chimiquement à la charge blanche, une telle liaison pouvant être établie, par exemple, entre un atome de silicium de l'agent de couplage et les groupes hydroxyle (OH) de surface de la charge blanche (par exemple les silanols de surface lorsqu'il s'agit de silice) ;
- X représente un groupe fonctionnel (fonction "X") capable de se lier physiquement et/ou chimiquement à l'élastomère, par exemple par l'intermédiaire d'un atome de soufre ;
- B représente un groupe hydrocarboné permettant de relier Y et X.

Les agents de couplage ne doivent en particulier pas être confondus avec de simples agents de recouvrement de charge blanche qui de manière connue peuvent comporter la fonction Y active vis-à-vis de la charge blanche mais sont dépourvus de la fonction X active vis-à-vis de l'élastomère.

Des agents de couplage, notamment silice-élastomère, ont été décrits dans un grand nombre de documents, les plus connus étant des alkoxysilanes bifonctionnels.

Ainsi il a été proposé dans la demande de brevet FR-A-2 094 859 d'utiliser un mercaptosilane pour augmenter l'affinité de la silice avec la matrice élastomère. Il a été mis en évidence et il est aujourd'hui bien connu que les mercaptosilanes, et en particulier le γ -mercaptopropyltriéthoxysilane, sont susceptibles de procurer d'excellentes propriétés de couplage silice-élastomère, mais que l'utilisation industrielle de ces agents de couplage n'est pas possible en raison de la forte réactivité des fonctions -SH conduisant très rapidement au cours de la préparation de la composition d'élastomère(s) de type caoutchouc dans un mélangeur interne à des réactions de réticulation pendant le mélangeage, appelées encore "grillage" ("scorching"), à des viscosités élevées, en fin de compte à des compositions quasiment impossibles à travailler et à mettre en oeuvre industriellement. Pour illustrer cette impossibilité d'utiliser industriellement de tels agents de couplage et les compositions de caoutchouc les contenant, on peut citer les documents FR-A-2 206 330, US-A-4 002 594.

Pour remédier à cet inconvénient, il a été proposé de remplacer ces mercaptosilanes par des alkoxysilanes polysulfurés, notamment des polysulfures de bis-trialkoxyl (C_1 - C_4)silylpropyle tels que décrits dans de nombreux brevets ou demandes de brevet (voir par exemple FR-A-2 206 330, US-A-3 842 111, US-A-3 873 489, US-A-3 978 103, US-A-3 997 581). Parmi ces polysulfures, on citera notamment le tétrasulfure de bis 3-triéthoxysilylpropyle (en abrégé TESPT) qui est généralement considéré aujourd'hui comme le produit apportant, pour des vulcanisats chargés à la silice, le meilleur compromis en terme de sécurité au grillage, de facilité de mise en oeuvre et de pouvoir renforçant, mais dont l'inconvénient connu est d'être fort onéreux (voir par exemple brevets US-A-5 652 310, US-A-5 684 171, US-A-5 684 172).

Au vu de l'état antérieur de la technique, il apparaît donc qu'il existe un besoin non satisfait en des utilisations performantes d'agents de couplage à base de silanes fonctionnalisés dans des compositions d'élastomère(s) comprenant une matière siliceuse comme charge renforçante ou plus généralement comprenant une charge blanche renforçante.

La Demanderesse a découvert lors de ses recherches que, de manière inattendue, de nouveaux agents de couplage à base d'organoxysilanes porteurs d'une double liaison éthylénique activée particulière, présente sous la forme d'une fonction ester-maléamique ou d'une fonction ester-fumaramique, offrent des performances de couplage au moins équivalentes à celles liées à l'utilisation des alkoxysilanes polysulfurés, notamment le TESPT et évitent par ailleurs les problèmes de grillage prématuré ainsi que les problèmes de mise en oeuvre liés à une viscosité trop importante des compositions d'élastomère(s) à l'état cru, propres notamment aux mercaptosilanes.

Plus précisément, la présente invention, prise dans son troisième objet, concerne l'utilisation d'une quantité efficace d'au moins un composé constitué essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I), obtenu par l'un ou l'autre des procédés également décrits ci-avant, comme agent de couplage charge blanche-élastomère dans les compositions d'élastomère(s) naturel(s) et/ou synthétique(s) comprenant une charge blanche à titre de charge renforçante, qui sont destinées à la fabrication d'articles en élastomère(s).

Dans le cadre de cette application agent de couplage, la présente invention concerne encore les compositions d'élastomère(s) comprenant une charge blanche renforçante obtenues grâce à l'emploi d'une quantité efficace d'au moins un composé constitué essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I).

Plus précisément, ces compositions comprennent (les parties sont données en poids) :

- pour 100 parties d'élastomère(s),
- 10 à 150 parties de charge blanche renforçante, de préférence 20 à 100 et plus préférentiellement encore 30 à 80 parties,
- 0,5 à 20 parties, de préférence 1 à 15 parties et plus préférentiellement encore 3 à 12 parties de composé constitué essentiellement d'un organosilane de formule (I), pour 100 parties charge blanche renforçante.

Dans le présent mémoire, on entend définir par l'expression "charge blanche renforçante", une charge blanche capable de renforcer à elle seule, sans autre moyen que celui d'un agent de couplage, une composition d'élastomère(s) de type caoutchouc, naturels(s) ou synthétique(s).

L'état physique sous lequel se présente la charge blanche renforçante est indifférent, c'est-à-dire que ladite charge peut se présenter sous forme de poudre, de microperles, de granulés ou de billes.

De manière préférentielle, la charge blanche renforçante consiste dans la silice, l'alumine ou un mélange de ces deux espèces.

De manière plus préférentielle, la charge blanche renforçante consiste dans la silice, prise seule ou en mélange avec de l'alumine.

A titre de silice susceptible d'être mise en oeuvre dans l'invention conviennent toutes les silices précipitées ou pyrogénées connues de l'homme de l'art présentant une surface spécifique BET \leq à 450 m²/g. On préfère les silices de précipitation, celles-ci pouvant être classiques ou hautement dispersibles.

Par silice hautement dispersible, on entend toute silice ayant une aptitude à la désagglomération et à la dispersion dans une matrice polymérique très importante

observabl par microscopi électronique ou optique, sur coupes fines. Comme xemples non limitatifs de silices hautement dispersibles on peut citer celles ayant une surface spécifique CTAB égale ou inférieure à $450 \text{ m}^2/\text{g}$ et particulièrement celles décrites dans le brevet US-A-5 403 570 et les demandes de brevets WO-A-95/09127 et 5 WO-A-95/09128 dont le contenu est incorporé ici. Conviennent aussi les silices précipitées traitées telles que par exemple les silices "dopées" à l'aluminium décrite dans la demande de brevet EP-A-0 735 088 dont le contenu est également incorporé ici.

A titre plus préférentiel, conviennent bien les silices de précipitation ayant :

- 10 - une surface spécifique CTAB allant de 100 à $240 \text{ m}^2/\text{g}$, de préférence de 100 à $180 \text{ m}^2/\text{g}$,
- une surface spécifique BET allant de 100 à $250 \text{ m}^2/\text{g}$, de préférence de 100 à $190 \text{ m}^2/\text{g}$,
- une prise d'huile DOP inférieure à $300 \text{ ml}/100 \text{ g}$, de préférence allant de 200 à $295 \text{ ml}/100 \text{ g}$,
- 15 - un rapport spécifique BET/surface spécifique CTAB allant de 1,0 à 1,6.

Bien entendu par silice, on entend également des coupages de différentes silices. La surface spécifique CTAB est déterminée selon la méthode NFT 45007 de novembre 1987. La surface spécifique BET est déterminée selon la méthode de BRUNAUER, EMMET, TELLER décrite dans "The Journal of the American Chemical Society, vol. 80, 20 page 309 (1938)" correspondant à la norme NFT 45007 de novembre 1987. La prise d'huile DOP est déterminée selon la norme NFT 30-022 (mars 1953) en mettant en oeuvre le dioctylphtalate.

A titre d'alumine renforçante, on utilise avantageusement une alumine hautement dispersible ayant :

- 25 - une surface spécifique BET allant de 30 à $400 \text{ m}^2/\text{g}$, de préférence de 80 à $250 \text{ m}^2/\text{g}$,
 - une taille moyenne de particules au plus égale à 500 nm, de préférence au plus égale à 200 nm, et
 - un taux élevé de fonctions réactives de surface Al-OH,
- telle que décrite dans le document EP-A-0 810 258.

30 Comme exemples non limitatifs de pareilles aluminos renforçantes, on citera notamment les aluminos A125, CR125, D65CR de la société BAÏKOWSKI.

L'agent de couplage précédemment décrit pourrait être préalablement greffé (via la fonction "Y") sur la charge blanche renforçante, la charge ainsi "précouplée" pouvant être liée ultérieurement à l'élastomère, par l'intermédiaire de la fonction libre "X".

35 Par élastomères susceptibles d'être mis en oeuvre pour les compositions conformes au troisième objet de l'invention, on entend :

- (1) les homopolymères obtenus par polymérisation d'un monomère diène conjugué ayant de 4 à 22 atomes de carbone, comme par exemple : le butadiène-1,3, le méthyl-2 butadiène-1,3, le diméthyl-2,3 butadiène-1,3, le diéthyl-2,3 butadiène-1,3, le méthyl-2 éthyl-3 butadiène-1,3, le chloro-2 butadiène-1,3, le méthyl-2 isopropyl-3 butadiène-1,3, le phényl-1 butadiène-1,3, le pentadiène-1,3, l'hexadiène-2,4 ;
- (2) les copolymères obtenus par copolymérisation d'au moins deux des diènes conjugués précités entre eux ou par copolymérisation d'un ou plusieurs des diènes conjugués précités avec un ou plusieurs monomères insaturés éthyléniquement choisis parmi :
- les monomères vinyliques aromatiques ayant de 8 à 20 atomes de carbone, comme par exemple : le styrène, l'ortho-, méta- ou paraméthylstyrène, le mélange commercial "vinyl-toluène", le paratertiobutylstyrène, les méthoxystyrènes, les chlorostyrènes, le vinylmésitylène, le divinylbenzène, le vinylnaphthalène ;
 - les monomères nitriles vinyliques ayant de 3 à 12 atomes de carbone, comme par exemple l'acrylonitrile, le méthacrylonitrile ;
 - les monomères esters acryliques dérivés de l'acide acrylique ou de l'acide méthacrylique avec des alcanols ayant de 1 à 12 atomes de carbone, comme par exemple l'acrylate de méthyle, l'acrylate d'éthyle, l'acrylate de propyle, l'acrylate de n-butyle, l'acrylate d'isobutyle, l'acrylate d'éthyl-2 hexyle, le méthacrylate de méthyle, le méthacrylate d'éthyle, le méthacrylate de n-butyle, le méthacrylate d'isobutyle ;
- les copolymères peuvent contenir entre 99 % et 20 % en poids d'unités diéniques et entre 1 % et 80 % en poids d'unités vinyliques aromatiques, nitriles vinyliques et/ou esters acryliques ;
- (3) les copolymères obtenus par copolymérisation d'éthylène, avec une α -oléfine ayant de 3 à 6 atomes de carbone, comme par exemple les élastomères obtenus à partir d'éthylène et de propylène (élastomères EPR) ;
- (4) les copolymères ternaires obtenus par copolymérisation d'éthylène, d'une α -oléfine ayant 3 à 6 atomes de carbone avec un monomère diène non conjugué ayant de 6 à 12 atomes de carbone, comme par exemple les élastomères obtenus à partir d'éthylène, de propylène avec un monomère diène non conjugué du type précité tel que notamment l'hexadiène-1,4, l'éthylidène norbornène, le dicyclopentadiène (élastomère EPDM) ;
- (5) le caoutchouc naturel ;
- (6) les copolymères obtenus par copolymérisation d'isobutène et d'isoprène (caoutchouc butyle), ainsi que les versions halogénées, en particulier chlorées ou bromées, de ces copolymères ;

- (7) un mélange d plusieurs des élastomères précités (1) à (6) entre eux ;
- (8) les polyéthylènes chlorosulfonés ;
- (9) les hydrocarbures fluorés ;
- (10) les élastomères du type épichlorohydrine-oxyde d'éthylène ou polyépichlorohydrine.

5 A titre préférentiel, on fait appel à un ou plusieurs élastomère(s) choisi(s) parmi : (1) le polyisoprène [ou poly(méthyl-2 butadiène-1,3)] ; (2) le poly(isoprène-butadiène), le poly(isoprène-styrène), le poly(isoprène-butadiène-styrène) ; (5) le caoutchouc naturel ; (6) le caoutchouc butyle ; (7) un mélange des élastomères nommément précités (1), (2), (5), (6) entre eux ; (7') un mélange contenant une quantité majoritaire (allant de 51 % à 10 99,5 % et, de préférence, de 70 % à 99 % en poids) de polyisoprène (1) et/ou de caoutchouc naturel (5) et une quantité minoritaire (allant de 49 % à 0,5 % et, de préférence, de 30 % à 1 % en poids) de polybutadiène, de polychloroprène, de poly(butadiène-styrène) et/ou de poly(butadiène-acrylonitrile).

15 Les compositions conformes à l'invention peuvent contenir en outre, et il s'agit là d'une mesure préférentielle, au moins un activateur de couplage, apte à activer c'est-à-dire à augmenter la fonction de couplage de l'agent de couplage décrit précédemment ; cet activateur de couplage, utilisé en très faible proportion (au plus égale à 1 partie pour 100 parties en poids d'élastomère(s)), est un initiateur radicalaire (encore appelé 20 amorceur radicalaire) du type à amorçage thermique.

20 De manière connue, un initiateur radicalaire est un composé organique susceptible, suite à une activation énergétique, de générer des radicaux libres *in situ*, dans son milieu environnant. L'initiateur radicalaire qui peut être introduit dans les compositions de l'invention est un initiateur du type à amorçage thermique, c'est-à-dire que l'apport d'énergie, pour la création des radicaux libres doit se faire sous forme thermique. On 25 pense que la génération de ces radicaux libres peut favoriser, lors de la fabrication (malaxage thermomécanique) des compositions de caoutchouc, une meilleure interaction entre l'agent de couplage et l'élastomère diénique.

On choisit de préférence un initiateur radicalaire dont la température de décomposition est inférieure à 180°C, plus préférentiellement inférieure à 160°C, de 30 telles gammes de températures permettant de bénéficier pleinement de l'effet d'activation du couplage, lors de la fabrication des compositions conformes à l'invention.

L'activateur de couplage, quand on en utilise un, est choisi de préférence dans le groupe constitué par les peroxydes, les hydroperoxydes, les composés azido, les composés bis(azo), les peracides, les peresters ou un mélange de deux ou de plus de 35 deux d ces composés.

Plus préférentiellement, l'activateur de couplage, quand on en utilise un, est choisi dans le groupe constitué par les peroxydes, les composés bis(azo), les peresters ou un

mélange de deux ou de plus d'un de ces composés. A titre d'exemples, on cite notamment le peroxyde de benzoyl, le peroxyde d'acétyl, le peroxyde de lauryle, le peroxyde de cumyle, le peroxyde de t-butyle, le peracétate de t-butyle, l'hydropéroxyde de t-butyle, l'hydropéroxyde de cumène, le peroxyde de t-butyl cumyle, le peroxyde de 2,5-diméthyl-2,5-bis(t-butyl)-3-hexyne, le peroxyde de 1,3-bis(t-butyl-isopropyl) benzène, le peroxyde de 2,4-dichlorobenzoyl, le perbenzoate de t-butyle, le peroxyde de 1,1 bis(t-butyl)-3,3,5-triméthylcyclohexane, le 1,1'-azobis(isobutyronitrile) (en abrégé "AIBN"), le 1,1'-azobis(sepcentylnitrile), le 1,1'-azobis(cyclohexanecarbonitrile).

Selon un mode particulièrement préférentiel, l'initiateur radicalaire, quand on en utilise un, est le peroxyde de 1,1 bis(t-butyl)-3,3,5-triméthylcyclohexane.

Un tel composé est commercialisé, par exemple par la société Flexsys sous la dénomination Trigonox 29-40 (40% en poids de peroxyde sur un support solide de carbonate de calcium).

Selon un autre mode particulièrement préférentiel, l'initiateur radicalaire, quand on en utilise un, est le 1,1'-azobis(isobutyronitrile).

Un tel composé est commercialisé par exemple par la société Du Pont de Nemours sous la dénomination Vazo 64.

Comme indiqué précédemment, l'initiateur radicalaire, quand on en utilise un, est employé en très faible proportion dans les compositions conformes à l'invention, à savoir à un taux allant de 0,05 à 1 partie, de préférence de 0,05 à 0,5 partie, et plus préférentiellement encore de 0,1 à 0,3 partie, pour 100 parties d'élastomère(s).

Bien entendu, le besoin d'utiliser un activateur de couplage ainsi que la teneur optimale en activateur de couplage quand on en utilise un seront déterminés en fonction des conditions particulières de réalisation de l'invention, à savoir du type d'élastomère(s), de la nature de la charge blanche renforçante, et de la nature et de la quantité d'agent de couplage utilisé. De préférence, la quantité de l'activateur de couplage, quand on en utilise un, représente entre 1% et 10%, plus préférentiellement entre 2% et 6% en poids par rapport à la quantité de l'agent de couplage.

Les compositions conformes à l'invention contiennent en outre tout ou partie des autres constituants et additifs auxiliaires habituellement utilisés dans le domaine des compositions d'élastomère(s) et de caoutchouc(s).

Ainsi, on peut mettre en oeuvre tout ou partie des autres constituants et additifs suivants :

- s'agissant du système de vulcanisation, on citera par exemple :
 - des agents de vulcanisation choisis parmi le soufre ou des composés donneurs de soufre, comme par exemple des dérivés de thiurame ;

- des accélérateurs de vulcanisation, comme par exemple des dérivés de guanidine, des dérivés d' thiazoles ou des dérivés de sulfénamides ;
 - des activateurs de vulcanisation comme, par exemple l'oxyde de zinc, l'acide stérarique et le stéarate de zinc ;
- 5 • s'agissant d'autre(s) additif(s), on citera par exemple :
- une charge renforçante conventionnelle comme le noir de carbone (dans ce cas, la charge blanche renforçante mise en oeuvre constitue plus de 50 % du poids de l'ensemble charge blanche renforçante + noir de carbone) ;
 - une charge blanche conventionnelle peu ou non renforçante comme par
- 10 exemple des argiles, la bentonite, le talc, la craie, le kaolin, le dioxyde de titane ou un mélange de ces espèces ;
- des agents antioxydants ;
 - des agents antiozonants, comme par exemple la N-phényl-N'-(diméthyl-1,3 butyl)-p-phénylène-diamine ;
- 15 - des agents de plastification et des agents d'aide à la mise en œuvre.

S'agissant des agents d'aide à la mise en œuvre, les compositions conformes à l'invention peuvent contenir des agents de recouvrement de la charge renforçante comportant par exemple la seule fonction Y, susceptibles de manière connue, grâce à une amélioration de la dispersion de la charge dans la matrice de caoutchouc et à un

20 abaissement de la viscosité des compositions, d'améliorer la faculté de mise en œuvre des compositions à l'état cru. Pareils agents consistent par exemple dans des polyols, des polyéthers (par exemple des polyéthylèneglycols), des amines primaires, secondaires ou tertiaires (par exemple des trialcanol-amines), et des polydiméthylsiloxanes α,ω -dihydroxylés. Un pareil agent d'aide à la mise en œuvre,

25 quand on en utilise un, est employé à raison de 1 à 10 parties en poids, et de préférence 2 à 8 parties, pour 100 parties de charge blanche renforçante.

Le procédé de préparation des compositions d'élastomère(s) comprenant une charge blanche renforçante et une quantité efficace d'agent de couplage peut se faire selon un mode opératoire classique en une ou deux étapes.

30 Selon le procédé en une étape, on introduit et malaxe dans un mélangeur interne usuel, par exemple de type BANBURY ou de type BRABENDER, tous les constituants nécessaires à l'exception du (ou des) agent(s) de vulcanisation et éventuellement : du (ou des) accélérateurs de vulcanisation et/ou du (ou des) activateur(s) de vulcanisation. Le résultat de cette première étape de mélange est repris ensuite sur un mélangeur

35 extern , généralement un mélangeur à cylindres, et on y ajoute alors le (ou les) agent(s)

de vulcanisation et éventuellement : le (ou les) accélérateur(s) de vulcanisation et/ou le (ou les) activateur(s) de vulcanisation.

Il peut être avantageux pour la préparation de certains articles de mettre en œuvre un procédé en deux étapes conduites toutes les deux dans un mélangeur interne. Dans la première étape, sont introduits et malaxés tous les constituants nécessaires à l'exception du (ou des) agent(s) de vulcanisation et éventuellement : du (ou des) accélérateur(s) de vulcanisation et/ou du (ou des) activateurs de vulcanisation. Le but de la seconde étape qui suit est essentiellement de faire subir au mélange un traitement thermique complémentaire. Le résultat de cette seconde étape est repris également ensuite sur un mélangeur externe pour y ajouter le (ou les) agent(s) de vulcanisation et éventuellement : le (ou les) accélérateur(s) de vulcanisation, et/ou le (ou les) activateurs de vulcanisation.

La phase de travail en mélangeur interne est opérée généralement à une température allant de 80°C à 200°C, de préférence de 80°C à 180°C. Cette première phase de travail est suivie de la seconde phase de travail en mélangeur externe en opérant à une température plus basse, généralement inférieure à 120°C et de préférence allant de 25°C à 70°C.

La composition finale obtenue est ensuite calandree par exemple sous la forme d'une feuille, d'une plaque ou encore d'un profilé utilisable pour la fabrication d'articles en élastomère(s).

La vulcanisation (ou cuisson) est conduite de manière connue à une température allant généralement de 130°C à 200°C, pendant un temps suffisant qui peut varier par exemple entre 5 et 90 minutes en fonction notamment de la température de cuisson, du système de vulcanisation adopté et de la cinétique de vulcanisation de la composition considérée.

Il va de soi que la présente invention, prise dans son troisième objet, concerne les compositions d'élastomère(s) précédemment décrites tant à l'état cru (i.e., avant cuisson) qu'à l'état cuit (i.e., après réticulation ou vulcanisation).

Les compositions d'élastomère(s) vont servir à préparer des articles en élastomère(s) possédant un corps comprenant lesdites compositions. Ces compositions sont particulièrement utiles pour préparer des articles consistant dans des supports de moteurs, des semelles de chaussures, des galets de téléphérique, des joints d'appareillages électroménagers et des gaines de câbles.

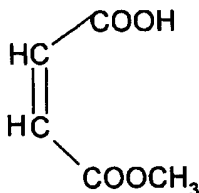
Les exemples suivants illustrent la présente invention.

EXEMPLE 1

Cet exemple décrit la préparation d'un composé constitué essentiellement d'un alcoxysilane de formule (I) comportant une fonction ester-maléamique, en mettant en œuvre la voie de synthèse passant par l'intermédiaire d'un dérivé ester activé (second
5 procédé selon l'invention).

1) Alcoololyse de l'anhydride maléique :

Dans un réacteur tétracol de 2 litres, l'anhydride maléique est introduit (698,1 g, soit 7,12 moles), puis il est fondu par chauffage du réacteur à l'aide d'un bain d'huile porté à 70°C. Une fois la totalité de l'anhydride fondue, on introduit, sous agitation, du méthanol
10 (221,4 g, soit 6,92 moles) via une ampoule de coulée. Le milieu est ensuite laissé sous agitation pendant 20 heures à 23°C, puis il est dévolatilisé en établissant une pression réduite de 10.10^2 Pa pendant 1 heure, et enfin il est filtré sur papier-filtre. On récupère ainsi 786,9 g de monométhylester de l'acide maléique de formule (rendement de 86 %) :

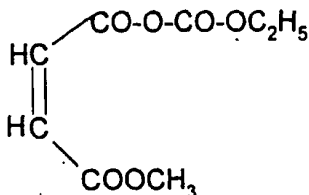


15

Préparation du dérivé ester activé, puis couplage avec le silane aminé :

Dans un réacteur tricol de 2 litres, équipé d'une agitation mécanique, d'un
20 réfrigérant et placé sous atmosphère d'argon, le monométhylester de l'acide maléique (219,7 g, soit 1,685 moles) est introduit et dissout dans le dichlorométhane CH_2Cl_2 (950 g). Le milieu réactionnel est refroidi à -60°C , puis de la N-méthylmorpholine (187,58 g, soit 1,854 moles) est ajoutée progressivement sur une période de 4 minutes. Au bout de ce temps, en opérant à cette même température de -60°C , on coule
25 progressivement de l'éthylchloroformiate $\text{Cl-CO-OC}_2\text{H}_5$ (201,21 g, soit 1,854 moles) sur une période de 10 minutes.

Le milieu réactionnel ainsi obtenu, qui renferme le dérivé ester activé de formule:



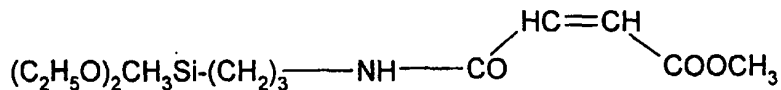
est abandonné pendant 10 minutes à la température où il se trouve.

Ensuite, le silane aminé de formule $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{CH}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ (322,43 g, soit 1,685 moles) est coulé progressivement en 15 minutes via une ampoule de coulée. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation en laissant la température de la masse remonter doucement vers la température ambiante de 23°C. Une fois arrivé à température ambiante, le milieu est encore agité pendant 2 heures à cette température, puis il est filtré sur verre-fritté et le solvant est finalement éliminé par évaporation.

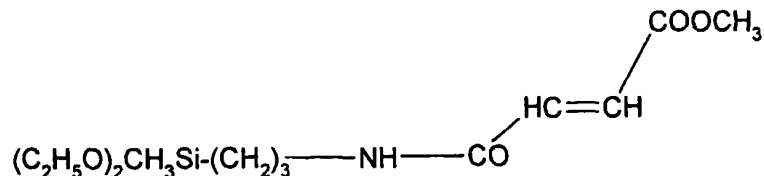
Le composé résiduel obtenu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant comme éluant un mélange heptane / acétate d'éthyle, 50/50 en volume ; l'éluant est ensuite éliminé par évaporation.

Le composé purifié obtenu a été soumis à des analyses par RMN du proton et par RMN du silicium (^{29}Si). Les résultats de ces analyses révèlent que le composé obtenu renferme (les pourcentages molaires indiqués ci-après expriment le nombre de motifs organosiliciques pour 100 atomes de silicium présents dans le composé obtenu) :

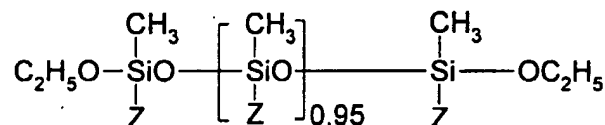
- 81,9 % molaire de motif codé D(OC_2H_5)₂ de formule $\text{CH}_3\text{ZSi}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ appartenant au silane à fonction ester-maléamique de formule (présent à raison de 83,2 % en poids) :



- 9,1 % molaire de motif codé D(OC_2H_5)₂ de formule $\text{CH}_3\text{ZSi}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ appartenant au silane à fonction ester-fumaramique de formule (présent à raison de 9,2 % en poids) :



- et 9 % molaire de motifs codés D(OC₂H₅) et D de formules CH₃Z (OC₂H₅)SiO_{1/2} + CH₃ZSiO_{2/2} appartenant à l'oligomère de formule (présent à raison de 7,6 % en poids) :



5 où Z = -(CH₂)₃-NH-CO-CH=CH-COOCH₃.

EXEMPLES 2 et 3

10 Ces exemples ont pour but de démontrer : d'une part les performances de couplage améliorées (charge blanche-élastomères diéniques) d'un composé essentiellement constitué d'un alkoxysilane de formule (I) porteur d'une fonction ester-maléamique, utilisé seul ; et d'autre part la possibilité d'accroître ces performances de couplage améliorées en utilisant l'agent de couplage précité auquel est associé un peroxyde à titre d'initiateur radicalaire à amorçage thermique. Ces performances sont comparées à celles d'un agent de couplage conventionnel TESPT (ou tétrasulfure de bis 3-triéthoxysilylpropyl).

15 On compare 4 compositions d'élastomères diéniques représentatives de formulations de semelles de chaussures. Ces 4 compositions sont identiques aux différences près qui suivent :

- composition n° 1 (témoin 1) : agent de couplage TESPT (4 pce ou parties en poids pour cent parties d'élastomères) utilisé seul ;
- composition n° 2 (témoin 2) : TESPT (4 pce) auquel est associé 0,12 pce de peroxyde ;
- composition n° 3 (exemple 2) : composés essentiellement constitué d'un alkoxysilane de formule (I) consistant dans l'ester méthylique de l'acide N-[γ-propyl(méthyl-diéthoxy)silane] maléamique (5,3 pce), utilisé seul ;
- composition n° 4 (exemple 3) : agent de couplage de la composition n° 3 (5,3 pce), auquel est associé 0,12 pce de peroxyde.

1) Constitution des compositions d'élastomères diéniques

30

Dans un mélangeur interne de type BRABENDER, on prépare les compositions suivantes dont la constitution, exprimée en parties en poids, est indiquée dans le tableau I donné ci-après :

Tableau I

Composition		Témoin 1	Témoin 2	Exemple 2	Exemple 3
Caoutchouc NR	(1)	85	85	85	85
Caoutchouc BR 1220	(2)	15	15	15	15
Silice	(3)	50	50	50	50
Oxyde de zinc	(4)	5	5	5	5
Acide stéarique	(5)	2	2	2	2
Silane TESPT	(6)	4	4	--	--
Composé silane ester maléamique	(7)	--	--	5,3	5,3
TBBS	(8)	2	2	2	2
DPG	(9)	1,4	1,4	1,4	1,4
Soufre	(10)	1,7	1,7	1,7	1,7
Péroxyde pur	(11)	--	0,12	--	0,12

- (1) Caoutchouc naturel, d'origine Malaisienne, commercialisé par la Société SAFIC-ALCAN sous la référence SMR 5L ;
- (2) Caoutchouc de polybutadiène à haut taux de produits d'addition cis-1,4, commercialisé par la Société SMPC ;
- (3) Silice Zéosil 1165 MP, commercialisé par la Société RHODIA - Silices ;
- (4) et (5) Activateurs de vulcanisation ;
- (6) Tétrasyulfure de bis 3-triéthoxysilylpropyle, commercialisé par la Société DEGUSSA sous la dénomination Si-69 ;
- (7) Composé essentiellement constitué d'un alkoxysilane à double liaison activée de formule (I) consistant dans l'ester méthylique de l'acide N-[γ -propyl-(méthyl-diéthoxy)silane] maléamique, préparé comme indiqué ci-avant dans l'exemple 1) ;
- (8) N-tertiobutyl-2-benzothiazyl-sulfénamide (accélérateur de vulcanisation) ;
- (9) Diphenyl guanidine (accélérateur de vulcanisation) ;
- (10) Agent de vulcanisation ;
- (11) Péroxyde de 1,1-bis(t-butyl)-3,3,5-triméthylcyclohexane, commercialisé par la Société FLEXSYS sous la dénomination Trigonox 29-40, qui renferme 40 % en poids de peroxyde pur déposé sur un support solide de carbonate de calcium ; la quantité indiquée dans le tableau I correspond à la proportion réelle de peroxyde pris à l'état pur, c'est-à-dire sans le support carbonate de calcium.

2) Préparation des compositions :

Dans un mélangeur interne de type BRABENDER, on introduit les divers constituants dans l'ordre, aux temps et aux températures indiqués ci-après :

5

<u>Temps</u>	<u>Température</u>	<u>Constituants</u>
0 minute	90°C	Caoutchouc NR
1 minute		Caoutchouc BR
2 minutes	105°C	2/3 silice + silane TESPT ou composé silane ester maléamique + peroxyde quand on l'utilise
4 minutes	120°C	1/3 silice + acide stéarique + oxyde de zinc

La vidange ou tombée du contenu du mélangeur se fait après 5 minutes. La température atteinte se situe dans l'intervalle allant de 140 à 145°C.

Le mélange obtenu est introduit ensuite sur un mélangeur à cylindres, maintenu à 30°C, et on introduit le TBBS, la DPG et le soufre. Après homogénéisation, le mélange final est calandré sous la forme de feuilles de 2,5 à 3 mm d'épaisseur.

10

3) Propriétés rhéologiques des compositions :

Les mesures sont réalisées sur les compositions à l'état cru. On a porté dans le tableau II suivant les résultats concernant le test de rhéologie qui est conduit à 160°C pendant 30 minutes à l'aide d'un rhéomètre MONSANTO 100 S.

15

Selon ce test la composition à tester est placée dans la chambre d'essai réglée à la température de 160°C, et on mesure le couple résistant, opposé par la composition, à une oscillation de faible amplitude d'un rotor biconique inclus dans la chambre d'essai, la composition remplissant complètement la chambre considérée. A partir de la courbe de variation du couple en fonction du temps, on détermine : le couple minimum qui reflète la viscosité de la composition à la température considérée ; le couple maximum et le delta-couple qui reflètent le taux de réticulation entraîné par l'action du système de vulcanisation ; le temps T-90 nécessaire pour obtenir un état de vulcanisation correspondant à 90 % de la vulcanisation complète (ce temps est pris comme optimum de vulcanisation) ; et le temps de grillage TS-2 correspondant au temps nécessaire pour avoir une remontée de 2 points au dessus du couple minimum à la température

20

25

considéré (160°C) et qui reflète le temps pendant lequel il est possible de mettre en oeuvre les mélanges crus à cette température sans avoir d'initiation de la vulcanisation.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau II.

5

Tableau II

Rhéologie MONSANTO	Témoin 1	Témoin 2	Exemple 2	Exemple 3
Couple mini	12,8	12,3	9,2	10
Couple maxi	105	106	98	99
Delta-couple	94,2	95,7	88,8	90
TS-2 (minutes)	3,5	3	2	1,75
TS-90 (minutes)	6,8	6,6	4	3,7

4) Propriétés mécaniques des vulcanisats :

Les mesures sont réalisées sur les compositions vulcanisées à l'optimum (température : 160°C ; durées pour chaque composition : temps T-90 indiqués dans le tableau II).

Les propriétés mesurées et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III suivant :

15

Tableau III

Propriétés mécaniques	Témoin1	Témoin 2	Exemple 2	Exemple 3
Module 10 % (1)	0,80	0,82	0,90	0,81
Module 100 % (1)	2,5	2,65	2,7	2,9
Module 300 % (1)	10,5	10,9	11	13,5
Module 400 % (1)	15,8	16,4	16,7	20,9
Allongement à la rupture (1)	610	540	595	475
Résistance à la rupture (1)	27,9	25	29	26
Indices de renforcement :				
M 300 % / M 100 %	4,2	4,1	4,1	4,6
M 400 % / M 100 %	6,3	6,2	6,2	7,2
Dureté Shore A (2)	71	72	75	72
Résistance à l'abrasion (3)	121	120	103	93

- (1) Les essais de traction sont réalisés conformément aux indications de la norme NF T 46-002 avec des éprouvettes de type H2. Les modules 10 %, 100 %, 300 %, 400 %, et la résistance à la rupture sont exprimés en MPa ; l'allongement à la rupture est exprimé en %.
- 5 (2) La mesure est réalisée selon les indications de la norme ASTM D 3240. La valeur donnée est mesurée à 15 secondes.
- (3) La mesure est réalisée selon les indications de la norme NF T 46-012 en utilisant la méthode 2 avec porte éprouvette tournant. La valeur mesurée est la perte de substance (en mm³) à l'abrasion ; plus elle est faible et meilleure est la résistance à l'abrasion.
- 10

L'examen des différents résultats des tableaux II et III conduit aux observations suivantes. Au niveau des mélanges crus, les compositions conformes à l'invention (exemples 2 et 3) présentent des couples mini bas qui traduisent une bonne dispersion de la charge silice et l'absence de grillage pendant la mise en œuvre.

15

Après cuisson, les compositions conformes à l'invention (cf. exemples 2 et 3) présentent des résistances à l'abrasion qui sont significativement supérieures à celles obtenues avec les compositions couplées avec le TESPT et le peroxyde améliore significativement cette propriété. En présence de peroxyde, la composition selon l'invention (cf. exemple 3) présente les valeurs les plus élevées de module sous forte déformation (M 300, M 400) et d'indices de renforcement. Toutes ces valeurs les plus élevées en matières de résistance à l'abrasion, de module sous forte déformation et d'indice de renforcement sont les indicateurs connus de l'homme de métier d'une amélioration significative du couplage charge blanche-élastomères grâce à l' (aux) agent(s) de couplage selon l'invention, utilisé(s) seul(s) ou en association avec un activateur de couplage.

20

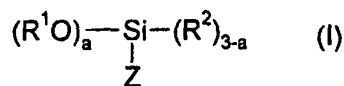
25

30

35

REVENDEICATIONS

1) Composés constitués essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule :

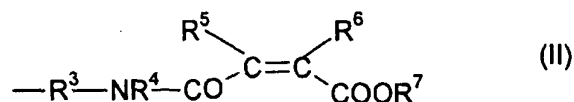


5

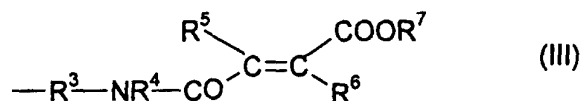
dans laquelle :

- les symboles R^1 identiques ou différents représentent chacun un groupe hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 4 atomes de carbone ; un radical alkoxyalkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 2 à 6 atomes de carbone ; un radical cycloalkyle ayant de 5 à 8 atomes de carbone ; et un radical phényle ;
- les symboles R^2 identiques ou différents représentent chacun un groupe hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; un radical cycloalkyle ayant de 5 à 8 atomes de carbone ; et un radical phényle ;
- Z est une fonction, comprenant une double liaison éthylénique activée, choisie parmi :
 - une fonction ester-maléamique Z^2 de formule :

20



- et une fonction ester-fumaramique Z^3 de formule :



25

formules dans lesquelles :

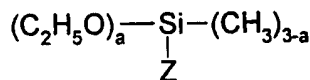
- + R³ est un radical hydrocarboné divalent alkylèn , linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 10 atomes de carbone, pouvant être interrompu par au moins un hétéroatome oxygéné, dont la valence libre portée par un atome de carbone est r lié à l'atome de Si ;
- 5 + les symboles R⁴, R⁵ et R⁶, identiques ou différents entre eux, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupe hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et un radical phényle ;
- + R⁷ est un groupe hydrocarboné monovalent choisi parmi : un radical alkyle, linéaire ou ramifié, ayant de 1 à 6 atomes de carbone ; et un radical phényle ;
- 10 - a est un nombre choisi parmi 1, 2 et 3.

2) Composés selon la revendication 1, caractérisés en ce que dans la formule (I) :

- les radicaux R¹ sont choisis parmi les radicaux : méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, n-butyle, CH₃OCH₂- , CH₃OCH₂CH₂- , CH₃OCH(CH₃)CH₂- ;
- 15 • les radicaux R² sont choisis parmi les radicaux : méthyle, éthyle, n-propyle, isopropyle, n-butyle, n-pentyle, cyclohexyle et phényle ;
- les fonctions représentées par le symbole Z sont choisies parmi les fonctions de formules (II) et (III) dans lesquelles :
- 20 - le symbole R³ représente un reste alkylène qui répond aux formules suivantes : -(CH₂)₂- , -(CH₂)₃- , -(CH₂)₄- , -CH₂-CH(CH₃)- , -(CH₂)₂-CH(CH₃)-(CH₂)- , -(CH₂)₃-O-(CH₂)₃- , -(CH₂)₃-O-CH₂-CH(CH₃)-CH₂- ;
- les symboles R⁴, R⁵ et R⁶ sont choisis parmi : un atome d'hydrogène, et les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle, n-butyle ;
- 25 - le symbole R⁷ est choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle et isopropyle.

3) Composés selon la revendication 2, caractérisés en ce que les organosilanes fonctionnalisés répondant à la formule (I), sont ceux de formule :

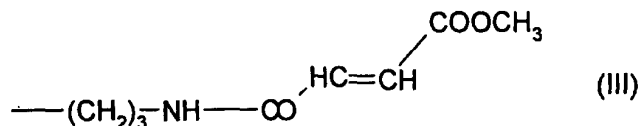
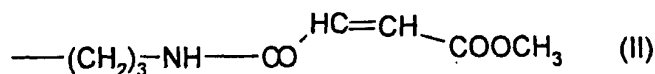
30



où :

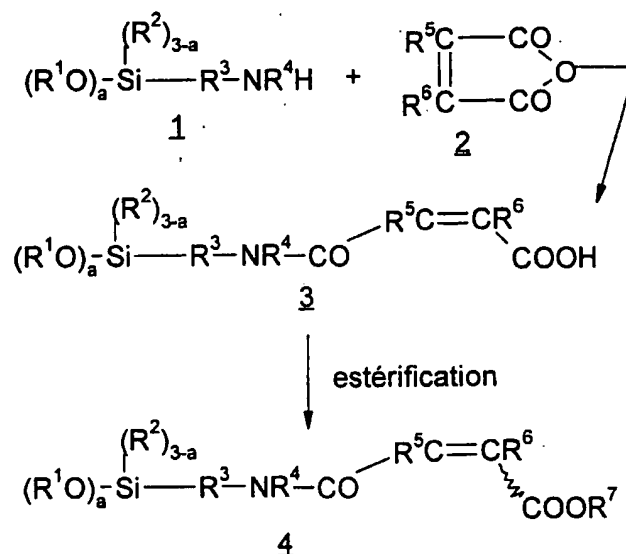
- a est un nombre égal à 2 ou 3,

- I symbol Z répond aux formules (II) et (III) suivantes :



- 4) Composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'ils se présentent sous forme d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I) à l'état pur ou sous forme d'un mélange de pareil organosilane avec une quantité égale ou inférieure à 40 % molaire dans le mélange, d'autre(s) composé(s) organosilicique(s) comprenant :
- en quantité égale ou inférieure à 10 % molaire : l'organosilane fonctionnalisé de formule (I) qui est l'isomère de l'organosilane, principalement obtenu, c'est-à-dire l'organosilane trans de formule (I) où Z est la fonction Z³ de formule (III), quand l'organosilane principalement obtenu est l'organosilane cis de formule (I) où Z est la fonction Z² de formule (II) et inversement ; et/ou
 - en quantité égale ou inférieure à 30 % molaire : au moins un oligomère siloxane linéaire, cyclique et/ou en réseau formé de motifs répondant aux formules suivantes : (R⁸)₂ZSiO_{1/2} (IV-1), R⁸ZSiO_{2/2} (IV-2) et/ou ZSiO_{3/2} (IV-3), dans lesquelles : les symboles R⁸ identiques ou différents représentent chacun un radical monovalent choisi parmi le radical hydroxyle et/ou les radicaux répondant aux définitions de OR¹ et R² ; les symboles R¹, R² et Z sont tels que définis supra ; et le nombre total de motifs de formules (IV-1) à (IV-3), par molécule d'oligomère, est un nombre entier ou fractionnaire supérieur à 1.

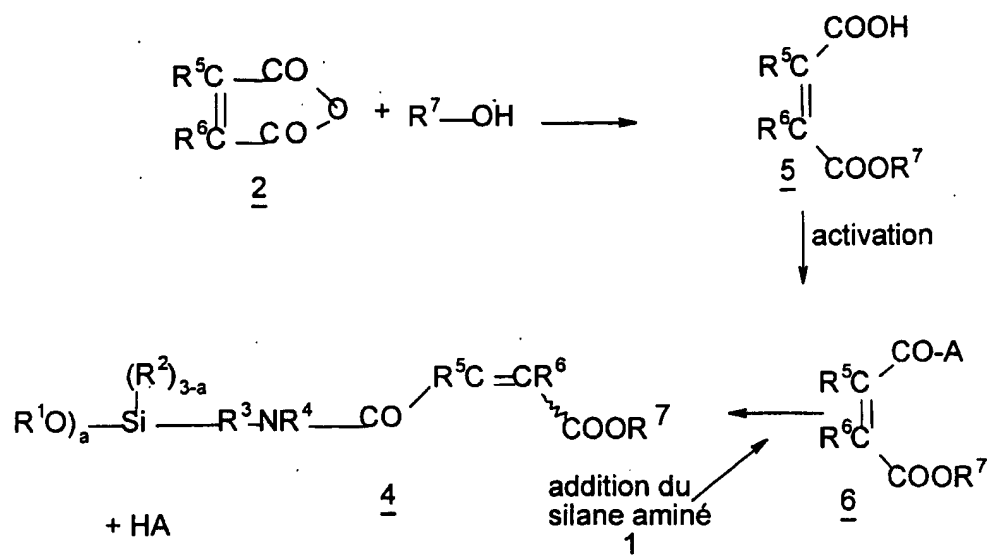
- 5) Procédé de préparation des composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdits composés sont préparés par estérification du dérivé acide maléamique intermédiaire en réalisant les étapes suivantes : (1) réaction de couplage entre un silane aminé 1 et l'anhydride maléique 2, puis (2) réaction d'estérification du dérivé de l'acide maléamique formé 3 pour conduire au composé constitué essentiellement de l'organosilane fonctionnalisé souhaité 4, en appliquant le schéma de synthèse suivant :



où les symboles R^1 à R^7 et a ont les significations données ci-avant dans l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5

- 6) Procédé de préparation des composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdits composés sont préparés par formation d'une fonction amide en additionnant un silane aminé 1 sur un dérivé ester activé 6 obtenu à partir d'un mono-ester de l'acide maléique 5, en réalisant les étapes suivantes :
- 10 (1) alcoolyse de l'anhydride maléique 2 par l'alcool $R^7\text{-OH}$, (2) activation de la fonction acide carboxylique du mono-ester de l'acide maléique 5 obtenu, en utilisant les diverses méthodes d'activation décrites dans le domaine de la synthèse peptidique, pour conduire au dérivé ester activé 6, puis (3) addition du silane aminé 1 sur ledit dérivé ester activé 6 pour conduire au composé constitué essentiellement de l'organosilane fonctionnalisé
- 15 souhaité 4, en appliquant le schéma de synthèse suivant :

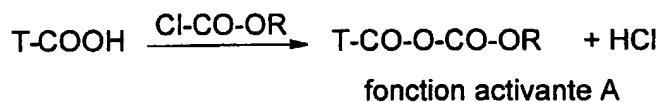


où le symbole A du dérivé 6 représente une fonction activante, et où les symboles R¹ à R⁷ et a ont les significations données ci-avant dans l'une quelconque des revendications

1 à 3.

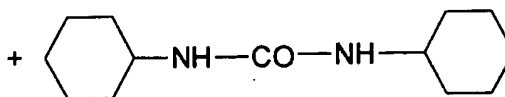
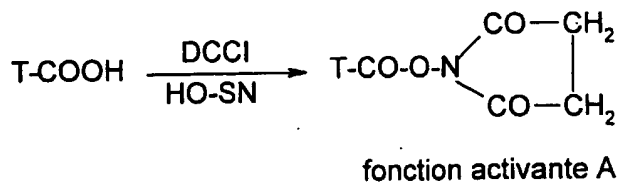
7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'activation de la fonction acide carboxylique du mono-ester de l'acide maléique 5 se fait en mettant en œuvre les méthodes suivantes :

- (j) activation par réaction avec un alkylchloroformiate, selon le schéma :



où T représente le reste $-\text{R}^5\text{C}=\text{CR}^6-\text{COOR}^7$ et R représente un radical alkyle linéaire ayant par exemple 1 à 3 atomes de carbone ;

- (2j) activation par réaction avec le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) en présence de N-hydroxysuccinimide (HO-SN), selon le schéma :



- 8) Utilisation d'une quantité efficace d'au moins un composé constitué essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou d'au moins un composé constitué essentiellement d'un organosilane de formule (I) obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, comme agent de couplage charge blanche-élastomère dans les compositions d'élastomère(s) de type caoutchouc, naturel(s) ou synthétique(s), comprenant une charge blanche à titre de charge renforçante, qui sont destinées à la fabrication d'articles en élastomère(s).

- 9) Compositions d'élastomère(s) comprenant une charge blanche renforçante obtenues grâce à l'emploi d'une quantité efficace d'au moins un composé constitué essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou d'au moins un composé constitué essentiellement d'un organosilane de formule (I) obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.

- 10) Compositions selon la revendication 9, caractérisées en ce qu'elles comprennent (les parties sont données en poids) :

- pour 100 parties d'élastomère(s),
- 10 à 150 parties de charge blanche renforçante,
- 0,5 à 20 parties de composé constitué essentiellement d'un organosilane de formule (I), pour 100 parties charge blanche renforçante.

25

- 11) Composition selon la revendication 10, caractérisées en ce qu'elles comprennent :

- pour 100 parties d'élastomère(s),
- 20 à 100 parties de charge blanche,

- 1 à 15 parties de composé constitué essentiellement d'un organosilane de formule (I), pour 100 parties charge blanche.

12) Compositions selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisées en ce que la charge blanche renforçante consiste dans la silice, l'alumine ou un mélange de ces deux espèces.

13) Compositions selon la revendication 12, caractérisées en ce que :

- la silice est une silice de précipitation, classique ou hautement dispersible, présentant notamment une surface spécifique BET \leq à 450 m²/g ;
- l'alumine est une alumine hautement dispersible, présentant notamment une surface spécifique BET allant de 30 à 400 m²/g et un taux élevé de fonction réactive de surface Al-OH.

14) Composition selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, caractérisées en ce que le (ou les) élastomères est (sont) choisi(s) parmi :

- (1) les homopolymères obtenus par polymérisation d'un monomère diène conjugué ayant de 4 à 22 atomes de carbone ;
- (2) les copolymères obtenus par copolymérisation d'au moins deux des diènes conjugués précités entre eux ou par copolymérisation d'un ou plusieurs des diènes conjugués précités avec un ou plusieurs monomères insaturés éthyléniquement choisis parmi :
 - les monomères vinyliques aromatiques ayant de 8 à 20 atomes de carbone ;
 - les monomères nitriles vinyliques ayant de 3 à 12 atomes de carbone ;
 - les monomères esters acryliques dérivés de l'acide acrylique ou de l'acide méthacrylique avec des alcools ayant de 1 à 12 atomes de carbone ;les copolymères peuvent contenir entre 99 % et 20 % en poids d'unités diéniques et entre 1 % et 80 % en poids d'unités vinyliques aromatiques, nitriles vinyliques et/ou esters acryliques ;
- (3) les copolymères obtenus par copolymérisation d'éthylène, avec une α -oléfine ayant de 3 à 6 atomes de carbone ;
- (4) les copolymères ternaires obtenus par copolymérisation d'éthylène, d'une α -oléfine ayant 3 à 6 atomes de carbone avec un monomère diène non conjugué ayant de 6 à 12 atomes de carbone ;
- (5) le caoutchouc naturel ;

- (6) les copolymères obtenus par copolymérisation d'isobutène et d'isoprène (caoutchouc butyl) ainsi que les versions halogénées de ces copolymères ;
(7) un mélange de plusieurs des élastomères précités (1) à (6) entre eux ;
(8) les polyéthylènes chlorosulfonés ;
5 (9) les hydrocarbures fluorés ;
(10) les élastomères du type épichlorohydrine-oxyde d'éthylène ou polyépichlorohydrine.

15 15) Compositions selon la revendication 14, caractérisées en ce que l'on fait appel à un ou plusieurs élastomère(s) choisi(s) parmi : (1) le polyisoprène [ou poly(méthyl-2 butadiène-1,3)] ; (2) le poly(isoprène-butadiène), le poly(isoprène-styrène), le poly(isoprène-butadiène-styrène) ; (5) le caoutchouc naturel ; (6) le caoutchouc butyle ;
(7) un mélange des élastomères nommément précités (1), (2), (5), (6) entre eux ; (7') un mélange contenant une quantité majoritaire (allant de 51 % à 99,5 % et, de préférence, de 70 % à 99 % en poids) de polyisoprène (1) et/ou de caoutchouc naturel (5) et une
20 quantité minoritaire (allant de 49 % à 0,5 % et, de préférence, de 30 % à 1 % en poids) de polybutadiène, de polychloroprène, de poly(butadiène-styrène) et/ou de poly(butadiène-acrylonitrile).

25 16) Compositions selon l'une quelconque des revendications 9 à 15, caractérisées en ce qu'elles contiennent en outre au moins un activateur de couplage, apte à activer c'est-à-dire à augmenter la fonction de couplage de l'agent de couplage ; cet activateur de couplage, utilisé en très faible proportion allant de 0,05 à 1 partie pour 100 parties en poids d'élastomère(s), étant un initiateur radicalaire (encore appelé amorceur radicalaire) du type à amorçage thermique.

30 17) Composition selon la revendication 16, caractérisées en ce que le (ou les) activateur(s) de couplage est (sont) choisi(s) dans le groupe constitué par les peroxydes, les hydroperoxydes, les composés azido, les composés bis(azo), les peracides, les peresters ou un mélange de deux ou de plus de deux de ces composés.

35 18) Compositions selon la revendication 16 ou 17, caractérisées en ce que le (ou les) activateur(s) de couplage est (sont) utilisé(s) en proportion allant de 0,05 à 0,5 partie pour 100 parties d'élastomère(s).

19) Compositions selon l'une quelconque des revendications 9 à 18, caractérisées en ce qu'elles contiennent en outre tout ou partie des autres constituants et additifs auxiliaires habituellement utilisés dans le domaine des compositions d'élastomère(s) et de caoutchouc(s), lesdits autres constituants et additifs comprenant :

- 5 • s'agissant du système de vulcanisation :
 - des agents de vulcanisation ;
 - des accélérateurs de vulcanisation ;
 - des activateurs de vulcanisation ;
- s'agissant d'autre(s) additif(s) :
 - 10 - une charge renforçante conventionnelle comme le noir de carbone ;
 - une charge blanche conventionnelle peu ou non renforçante ;
 - des agents antioxydants ;
 - des agents antiozonants ;
 - des agents de plastification et des agents d'aide à la mise en œuvre.

15

20) Procédé de préparation des compositions d'élastomère(s) diénique(s) selon l'une quelconque des revendications 9 à 19, caractérisé en ce que :

- on introduit et malaxe dans un mélangeur interne usuel, en une ou deux étapes, tous les constituants nécessaires à l'exception du (ou des) agent(s) de vulcanisation et éventuellement : du (ou des) accélérateurs de vulcanisation et/ou du (ou des) activateur(s) de vulcanisation, en opérant à une température allant de 80°C à 200°C ;
- puis le mélange ainsi obtenu est repris ensuite sur un mélangeur externe et on y ajoute alors le (ou les) agent(s) de vulcanisation et éventuellement : le (ou les) accélérateur(s) de vulcanisation et/ou le (ou les) activateur(s) de vulcanisation, en opérant à une température plus basse, inférieure à 120°C.

25

21) Articles en élastomère(s), caractérisés en ce qu'ils possèdent un corps comprenant une composition selon l'une quelconque des revendications 9 à 19.

30

22) Articles selon la revendication 21, caractérisés en ce qu'ils consistent dans des supports de moteurs, des semelles de chaussures, des galets de téléphérique, des joints d'appareillages électroménagers et des gaines de câbles.

23) Produits nouveaux, pouvant entrer dans la constitution des composés constitués essentiellement d'un organosilane fonctionnalisé de formule (I) qui ont été définis ci-avant dans la revendication 4, caractérisés en ce qu'ils consistent dans des oligomères ou des mélanges d'oligomères siloxanes linéaires, cycliques et/ou en réseau
5 formés de motifs répondant aux formules suivantes : $(R^8)_2ZSiO_{1/2}$ (VI-1), $R^8ZSiO_{2/2}$ (VI-2) et/ou $ZSiO_{3/2}$ (VI-3), dans lesquelles : les symboles R^8 identiques ou différents représentent chacun un radical monovalent choisi parmi le radical hydroxyle et/ou les radicaux répondant aux définitions de OR^1 et R^2 ; les symboles R^1 , R^2 et Z sont tels que définis supra ; et le nombre total de motifs de formules (VI-1) à (VI-3), par molécule
10 d'oligomère, est un nombre entier ou fractionnaire supérieur à 1.

15

20

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 00/03666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07F/18 C08K5/544 C08K5/5455

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07F C08K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAI, YU-CHIN ET AL: "Novel silicone hydrogels based on fumarate-capped prepolymers of polydimethylsiloxane" POLYM. MATER. SCI. ENG., vol. 76, 1997, pages 38-39, XP000939082 page 38	1,23
A	GB 1 439 247 A (DEGUSSA) 16 June 1976 (1976-06-16) cited in the application examples 1-11	1,7,8, 20,22

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2001

Date of mailing of the international search report

05/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bader, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

Int. Patent Application No
PCT/FR 00/03666

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 1439247 A	16-06-1976	DE 2255577 A	06-06-1974
		AR 200663 A	29-11-1974
		AT 327536 B	10-02-1976
		AT 949373 A	15-04-1975
		AU 6244873 A	15-05-1975
		BE 807222 A	13-05-1974
		BG 25805 A	12-12-1978
		CA 991836 A	29-06-1976
		CH 592131 A	14-10-1977
		CS 198130 B	30-05-1980
		DD 107935 A	20-08-1974
		ES 420455 A	16-07-1976
		FR 2206330 A	07-06-1974
		HU 168915 B	28-08-1976
		IL 43615 A	31-10-1976
		IN 140550 A	27-11-1976
		IT 997728 B	30-12-1975
		JP 847026 C	28-02-1977
		JP 50000031 A	06-01-1975
		JP 51020208 B	23-06-1976
		LU 68780 A	06-03-1975
		NL 7315530 A, B,	15-05-1974
		PH 12064 A	18-10-1978
		RO 67260 A	24-09-1981
		SE 396760 B	03-10-1977
		SU 522804 A	25-07-1976
		US 3873489 A	25-03-1975
		US 3997356 A	14-12-1976
		US 4076550 A	28-02-1978
		ZA 7308688 A	25-09-1974



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No
PCT/FR 00/03666

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07F7/18 C08K5/544 C08K5/5455

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07F C08K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LAI, YU-CHIN ET AL: "Novel silicone hydrogels based on fumarate-capped prepolymers of polydimethylsiloxane" POLYM. MATER. SCI. ENG., vol. 76, 1997, pages 38-39, XP000939082 page 38	1,23
A	GB 1 439 247 A (DEGUSSA) 16 juin 1976 (1976-06-16) cité dans la demande exemples 1-11	1,7,8, 20,22

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *A* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 mars 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/04/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bader, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De internationale No

PCT/FR 00/03666

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB 1439247 A	16-06-1976	DE 2255577 A	06-06-1974
		AR 200663 A	29-11-1974
		AT 327536 B	10-02-1976
		AT 949373 A	15-04-1975
		AU 6244873 A	15-05-1975
		BE 807222 A	13-05-1974
		BG 25805 A	12-12-1978
		CA 991836 A	29-06-1976
		CH 592131 A	14-10-1977
		CS 198130 B	30-05-1980
		DD 107935 A	20-08-1974
		ES 420455 A	16-07-1976
		FR 2206330 A	07-06-1974
		HU 168915 B	28-08-1976
		IL 43615 A	31-10-1976
		IN 140550 A	27-11-1976
		IT 997728 B	30-12-1975
		JP 847026 C	28-02-1977
		JP 50000031 A	06-01-1975
		JP 51020208 B	23-06-1976
		LU 68780 A	06-03-1975
		NL 7315530 A,B,	15-05-1974
		PH 12064 A	18-10-1978
		RO 67260 A	24-09-1981
		SE 396760 B	03-10-1977
		SU 522804 A	25-07-1976
		US 3873489 A	25-03-1975
		US 3997356 A	14-12-1976
		US 4076550 A	28-02-1978
		ZA 7308688 A	25-09-1974

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 novembre 2000 (01.11.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/00714	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 99014 G1
Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 mars 2000 (22.03.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 mars 1999 (22.03.99)
Déposant FRITIG, Bernard etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

05 octobre 2000 (05.10.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Maria Kirchner no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	---



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00 A01N63/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAPELLADES M ET AL: "THE MAIZE CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTER IS ACTIVE IN TRANSGENIC TOBACCO AND MAIZE PLANT TISSUES" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412	1-11, 14, 15, 24-32
Y	the whole document --- -/--	12, 13, 16-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 2000

Date of mailing of the international search report

12/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer:

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PELLEGRINI, LUCA ET AL: "Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O- methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment" PLANT PHYSIOL. (1993), 103(2), 509-17, XP002124694 the whole document</p> <p>-& PELLEGRINI, L.: "N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase" EMBL ACCESSION NO:X71430, 23 November 1993 (1993-11-23), XP002124695 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	12,13
X	<p>WO 96 36697 A (UNIV PENNSYLVANIA) 21 November 1996 (1996-11-21)</p>	21,22, 24-32
Y	<p>example 15</p> <p style="text-align: center;">----</p>	16-20,23
X	<p>KELLER, HARALD ET AL: "Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance" PLANT CELL (1999), 11(2), 223-235, February 1999 (1999-02), XP002124696</p>	21,22, 24-32
Y	<p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	16-20,23
Y	<p>WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 February 1995 (1995-02-09) table 3</p> <p style="text-align: center;">----</p>	23
X	<p>WO 99 09188 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ;BOERJAN WOUT (BE); CHEN CUIYING (BE) 25 February 1999 (1999-02-25)</p>	1-11, 14-16, 24-32
Y	<p>page 6 -page 9 page 17, line 5 - line 10</p> <p style="text-align: center;">----</p>	17-20
X	<p>WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 March 1993 (1993-03-18)</p>	1-11, 14-16, 24-32
	<p>page 11, line 11 - line 24; figure 4</p> <p style="text-align: center;">----</p>	
X	<p>GRIMMIG, BERNHARD ET AL: "Structure of the parsley caffeoyl -CoA O- methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element" PLANT MOL. BIOL. (1997), 33(2), 323-341, XP002054325 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-11, 14-16, 24-32
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 23, 8 June 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, LEE, J. E. ET AL.: "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)" XP002124705 abstract -& LEE, J.E., ET AL.: "Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds" EMBL ACCESSION NO:U54767, 23 August 1996 (1996-08-23), XP002124698 the whole document & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363,</p>	1-11
X	<p>CHEN, C.: "Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5" EMBL ACCESSION NO:AJ223620, 4 September 1998 (1998-09-04), XP002124699 the whole document</p>	1
X	<p>SASAKI, T., ET AL.: "Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03" EMBL ACCESSION NO: AB023482, 15 March 1999 (1999-03-15), XP002141362 see reverse complement of nts 44350-44495</p>	12
A	<p>PANABIERES, F.: "P.cryptogea X24 gene for cryptogein" EMBL ACCESSION NO:Z34459, 1 December 1994 (1994-12-01), XP002124700 the whole document & PANABIERESS, F., ET AL.: "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitins, protein inducing a hypersensitive-like response in tobacco" MOL PLANT MICROBE INTERACT., vol. 8, 1995, pages 996-1003, -& PANABIERES, F.: "Beta-elcitin cryptogein precursor" SWISSPROT ACCESSIO NO:P15570, 1 April 1990 (1990-04-01), XP002124701 the whole document</p>	18-20
A	<p>HUET, J.C., ET AL.: "Alpha-elicitin MGM-alpha" SWISSPROT ACCESSION NO:P35698, 1 June 1994 (1994-06-01), XP002124702 the whole document</p>	19,20
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No
PCT/FR 00/00714

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUET, J.C., ET AL.: "Beta-elicitin MGM-beta" SWISSPROT ACCESSION NO:P35699, 1 June 1994 (1994-06-01), XP002124703 the whole document ---	19,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 March 1994 (1994-03-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 129730, KAUFFMANN, S. ET AL: "Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco." XP002124706 abstract & DEV. PLANT PATHOL. (1993), 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), 140-3, ---	18-20
A	BAILLIEUL, F., ET AL.: "A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance" THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 4, 1995, pages 551-560, XP002124704 page 552, right-hand column ---	18-20
A	WO 91 15585 A (RIJKS LANDBOUWHOGESCHOOL) 17 October 1991 (1991-10-17) the whole document -----	1-32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den = Internationale No

PCT/FR 00/00714

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
W0 9636697 A	21-11-1996	US 5981843 A	09-11-1999
		AU 5732196 A	29-11-1996
		BG 102047 A	30-11-1998
		BR 9602338 A	13-01-1998
		CA 2221348 A	21-11-1996
		CN 1191565 A	26-08-1998
		CZ 9703656 A	17-06-1998
		EP 0828822 A	18-03-1998
		ES 2134170 A	16-09-1999
		HU 9802383 A	28-01-1999
		JP 11505423 T	21-05-1999
		PL 323383 A	30-03-1998
		ZA 9603957 A	25-11-1996
W0 9503690 A	09-02-1995	AU 7518994 A	28-02-1995
		CA 2168430 A	09-02-1995
		EP 0712273 A	22-05-1996
		JP 9503652 T	15-04-1997
		SG 46678 A	20-02-1998
		US 5670349 A	23-09-1997
		US 5689056 A	18-11-1997
		ZA 9405745 A	14-03-1995
W0 9909188 A	25-02-1999	AU 9072298 A	08-03-1999
W0 9305160 A	18-03-1993	AU 663726 B	19-10-1995
		AU 2516792 A	05-04-1993
		BR 9206481 A	31-10-1995
		EP 0603250 A	29-06-1994
		JP 6510429 T	24-11-1994
W0 9115585 A	17-10-1991	NL 9000773 A	01-11-1991
		AT 174931 T	15-01-1999
		AU 642252 B	14-10-1993
		AU 7684591 A	30-10-1991
		CA 2056439 A	03-10-1991
		DE 69130660 D	04-02-1999
		DE 69130660 T	17-06-1999
		EP 0474857 A	18-03-1992
		EP 0874055 A	28-10-1998
		ES 2128318 T	16-05-1999
		GR 3029461 T	28-05-1999
		JP 5505110 T	05-08-1993
		PT 97230 A, B	31-12-1991
		US 5866776 A	02-02-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00714

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9636697 A	21-11-1996	US 5981843 A	09-11-1999
		AU 5732196 A	29-11-1996
		BG 102047 A	30-11-1998
		BR 9602338 A	13-01-1998
		CA 2221348 A	21-11-1996
		CN 1191565 A	26-08-1998
		CZ 9703656 A	17-06-1998
		EP 0828822 A	18-03-1998
		ES 2134170 A	16-09-1999
		HU 9802383 A	28-01-1999
		JP 11505423 T	21-05-1999
		PL 323383 A	30-03-1998
		ZA 9603957 A	25-11-1996
WO 9503690 A	09-02-1995	AU 7518994 A	28-02-1995
		CA 2168430 A	09-02-1995
		EP 0712273 A	22-05-1996
		JP 9503652 T	15-04-1997
		SG 46678 A	20-02-1998
		US 5670349 A	23-09-1997
		US 5689056 A	18-11-1997
		ZA 9405745 A	14-03-1995
WO 9909188 A	25-02-1999	AU 9072298 A	08-03-1999
WO 9305160 A	18-03-1993	AU 663726 B	19-10-1995
		AU 2516792 A	05-04-1993
		BR 9206481 A	31-10-1995
		EP 0603250 A	29-06-1994
		JP 6510429 T	24-11-1994
WO 9115585 A	17-10-1991	NL 9000773 A	01-11-1991
		AT 174931 T	15-01-1999
		AU 642252 B	14-10-1993
		AU 7684591 A	30-10-1991
		CA 2056439 A	03-10-1991
		DE 69130660 D	04-02-1999
		DE 69130660 T	17-06-1999
		EP 0474857 A	18-03-1992
		EP 0874055 A	28-10-1998
		ES 2128318 T	16-05-1999
		GR 3029461 T	28-05-1999
		JP 5505110 T	05-08-1993
		PT 97230 A,B	31-12-1991
		US 5866776 A	02-02-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den = Internationale No
PCT/FR 00/00714

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00 A01N63/02		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A01H		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CAPELLADES M ET AL: "THE MAIZE CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTER IS ACTIVE IN TRANSGENIC TOBACCO AND MAIZE PLANT TISSUES" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412	1-11, 14, 15, 24-32
Y	le document en entier --- -/--	12, 13, 16-20
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 30 juin 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 12/07/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Maddox, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No
PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>PELLEGRINI, LUCA ET AL: "Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O- methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment" PLANT PHYSIOL. (1993), 103(2), 509-17, XP002124694 le document en entier</p> <p>-& PELLEGRINI, L.: "N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase" EMBL ACCESSION NO:X71430, 23 novembre 1993 (1993-11-23), XP002124695 le document en entier</p>	12,13
X	<p>WO 96 36697 A (UNIV PENNSYLVANIA) 21 novembre 1996 (1996-11-21) exemple 15</p>	21,22, 24-32
Y		16-20,23
X	<p>KELLER, HARALD ET AL: "Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance" PLANT CELL (1999), 11(2), 223-235, février 1999 (1999-02), XP002124696 le document en entier</p>	21,22, 24-32
Y		16-20,23
Y	<p>WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 février 1995 (1995-02-09) tableau 3</p>	23
X	<p>WO 99 09188 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ;BOERJAN WOUT (BE); CHEN CUIYING (BE) 25 février 1999 (1999-02-25) page 6 -page 9 page 17, ligne 5 - ligne 10</p>	1-11, 14-16, 24-32
Y		17-20
X	<p>WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 mars 1993 (1993-03-18) page 11, ligne 11 - ligne 24; figure 4</p>	1-11, 14-16, 24-32
X	<p>GRIMMIG, BERNHARD ET AL: "Structure of the parsley caffeoyl -CoA O- methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element" PLANT MOL. BIOL. (1997), 33(2), 323-341, XP002054325 le document en entier</p>	1-11, 14-16, 24-32
	<p>--- -/--</p>	

11
12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e internationale No

PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 23, 8 juin 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, LEE, J. E. ET AL: "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (Hordeum vulgare L.)" XP002124705 abrégé -& LEE, J.E., ET AL.: "Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds" EMBL ACCESSION NO:U54767, 23 août 1996 (1996-08-23), XP002124698 le document en entier & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363,</p>	1-11
X	<p>CHEN, C.: "Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5" EMBL ACCESSION NO:AJ223620, 4 septembre 1998 (1998-09-04), XP002124699 le document en entier</p>	1
X	<p>SASAKI, T., ET AL.: "Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03" EMBL ACCESSION NO: AB023482, 15 mars 1999 (1999-03-15), XP002141362 see reverse complement of nts 44350-44495</p>	12
A	<p>PANABIERES, F.: "P.cryptogea X24 gene for cryptogein" EMBL ACCESSION NO:Z34459, 1 décembre 1994 (1994-12-01), XP002124700 le document en entier & PANABIERESS, F., ET AL.: "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitins, protein inducing a hypersensitive-like response in tobacco" MOL PLANT MICROBE INTERACT., vol. 8, 1995, pages 996-1003, -& PANABIERES, F.: "Beta-elcitin cryptogein precursor" SWISSPROT ACCESSIO NO:P15570, 1 avril 1990 (1990-04-01), XP002124701 le document en entier</p>	18-20
A	<p>HUET, J.C., ET AL.: "Alpha-elicitin MGM-alpha" SWISSPROT ACCESSION NO:P35698, 1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124702 le document en entier</p>	19,20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Internationale No

PCT/FR 00/00714

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>HUET, J.C., ET AL.: "Beta-elicitin MGM-beta"</p> <p>SWISSPROT ACCESSION NO:P35699,</p> <p>1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124703</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	19,20
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11,</p> <p>14 mars 1994 (1994-03-14)</p> <p>Columbus, Ohio, US;</p> <p>abstract no. 129730,</p> <p>KAUFFMANN, S. ET AL: "Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco."</p> <p>XP002124706</p> <p>abrégé</p> <p>& DEV. PLANT PATHOL. (1993), 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), 140-3,</p> <p>---</p>	18-20
A	<p>BAILLIEUL, F., ET AL.: "A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance"</p> <p>THE PLANT JOURNAL,</p> <p>vol. 8, no. 4, 1995, pages 551-560,</p> <p>XP002124704</p> <p>page 552, colonne de droite</p> <p>---</p>	18-20
A	<p>WO 91 15585 A (RIJKSLANDBOUWHOGESCHOOL)</p> <p>17 octobre 1991 (1991-10-17)</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1-32

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 99014 G1	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 00714	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/03/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/03/1999
Déposant RHOBIO et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 5 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 00/00714

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/54 C12N15/82 A01H5/00 A01N63/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CAPELLADES M ET AL: "THE MAIZE CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE GENE PROMOTER IS ACTIVE IN TRANSGENIC TOBACCO AND MAIZE PLANT TISSUES" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412	1-11, 14, 15, 24-32
Y	le document en entier ----- -/--	12, 13, 16-20

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 juin 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/07/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>PELLEGRINI, LUCA ET AL: "Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O- methyltransferases induced in tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves by infection or elicitor treatment" PLANT PHYSIOL. (1993), 103(2), 509-17, XP002124694 le document en entier -& PELLEGRINI, L.: "N.tabacum mRNA for o-diphenol-O-methyltransferase" EMBL ACCESSION NO:X71430, 23 novembre 1993 (1993-11-23), XP002124695 le document en entier ---</p>	12,13
X	<p>WO 96 36697 A (UNIV PENNSYLVANIA) 21 novembre 1996 (1996-11-21) exemple 15 ---</p>	21,22, 24-32
Y		16-20,23
X	<p>KELLER, HARALD ET AL: "Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance" PLANT CELL (1999), 11(2), 223-235, février 1999 (1999-02), XP002124696 le document en entier ---</p>	21,22, 24-32
Y		16-20,23
Y	<p>WO 95 03690 A (VIRGINIA TECH INTELL PROP) 9 février 1995 (1995-02-09) tableau 3 ---</p>	23
X	<p>WO 99 09188 A (VLAAMS INTERUNIV INST BIOTECH ;BOERJAN WOUT (BE); CHEN CUIYING (BE) 25 février 1999 (1999-02-25) page 6 -page 9 page 17, ligne 5 - ligne 10 ---</p>	1-11, 14-16, 24-32
Y		17-20
X	<p>WO 93 05160 A (ICI PLC) 18 mars 1993 (1993-03-18) page 11, ligne 11 - ligne 24; figure 4 ---</p>	1-11, 14-16, 24-32
X	<p>GRIMMIG, BERNHARD ET AL: "Structure of the parsley caffeoyl -CoA O- methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element" PLANT MOL. BIOL. (1997), 33(2), 323-341, XP002054325 le document en entier ---</p>	1-11, 14-16, 24-32

	-/--	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 128, no. 23, 8 juin 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, LEE, J. E. ET AL.: "Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)" XP002124705 abrégé -& LEE, J.E., ET AL.: "Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds" EMBL ACCESSION NO:U54767, 23 août 1996 (1996-08-23), XP002124698 le document en entier & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363, ---</p>	1-11
X	<p>CHEN, C.: "Populus trichocarpa CCoAOMT2 gene, exon 1 to exon 5" EMBL ACCESSION NO:AJ223620, 4 septembre 1998 (1998-09-04), XP002124699 le document en entier ---</p>	1
X	<p>SASAKI, T., ET AL.: "Oryza sativa genomic DNA, chromosome 6, clone P0680A03" EMBL ACCESSION NO: AB023482, 15 mars 1999 (1999-03-15), XP002141362 see reverse complement of nts 44350-44495 ---</p>	12
A	<p>PANABIERES, F.: "P.cryptogea X24 gene for cryptogein" EMBL ACCESSION NO:Z34459, 1 décembre 1994 (1994-12-01), XP002124700 le document en entier & PANABIERESS, F., ET AL.: "Characterization of a gene cluster of Phytophthora cryptogea which codes for elicitors, protein inducing a hypersensitive-like response in tobacco" MOL PLANT MICROBE INTERACT., vol. 8, 1995, pages 996-1003, -& PANABIERES, F.: "Beta-elcitin cryptogein precursor" SWISSPROT ACCESSION NO:P15570, 1 avril 1990 (1990-04-01), XP002124701 le document en entier ---</p>	18-20
A	<p>HUET, J.C., ET AL.: "Alpha-elcitin MGM-alpha" SWISSPROT ACCESSION NO:P35698, 1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124702 le document en entier ---</p>	19,20

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUET, J.C., ET AL.: "Beta-elicitin MGM-beta" SWISSPROT ACCESSION NO:P35699, 1 juin 1994 (1994-06-01), XP002124703 le document en entier ---	19,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 11, 14 mars 1994 (1994-03-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 129730, KAUFFMANN, S. ET AL: "Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco." XP002124706 abrégé & DEV. PLANT PATHOL. (1993), 2(MECHANISMS OF PLANT DEFENSE RESPONSES), 140-3, ---	18-20
A	BAILLIEUL, F., ET AL.: "A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defense genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance" THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 4, 1995, pages 551-560, XP002124704 page 552, colonne de droite ---	18-20
A	W0 91 15585 A (RIJKSLANDBOUWHOGESCHOOL) 17 octobre 1991 (1991-10-17) le document en entier -----	1-32



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00714

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9636697	A	21-11-1996	US 5981843 A	09-11-1999
			AU 5732196 A	29-11-1996
			BG 102047 A	30-11-1998
			BR 9602338 A	13-01-1998
			CA 2221348 A	21-11-1996
			CN 1191565 A	26-08-1998
			CZ 9703656 A	17-06-1998
			EP 0828822 A	18-03-1998
			ES 2134170 A	16-09-1999
			HU 9802383 A	28-01-1999
			JP 11505423 T	21-05-1999
			PL 323383 A	30-03-1998
			ZA 9603957 A	25-11-1996
WO 9503690	A	09-02-1995	AU 7518994 A	28-02-1995
			CA 2168430 A	09-02-1995
			EP 0712273 A	22-05-1996
			JP 9503652 T	15-04-1997
			SG 46678 A	20-02-1998
			US 5670349 A	23-09-1997
			US 5689056 A	18-11-1997
			ZA 9405745 A	14-03-1995
WO 9909188	A	25-02-1999	AU 9072298 A	08-03-1999
WO 9305160	A	18-03-1993	AU 663726 B	19-10-1995
			AU 2516792 A	05-04-1993
			BR 9206481 A	31-10-1995
			EP 0603250 A	29-06-1994
			JP 6510429 T	24-11-1994
WO 9115585	A	17-10-1991	NL 9000773 A	01-11-1991
			AT 174931 T	15-01-1999
			AU 642252 B	14-10-1993
			AU 7684591 A	30-10-1991
			CA 2056439 A	03-10-1991
			DE 69130660 D	04-02-1999
			DE 69130660 T	17-06-1999
			EP 0474857 A	18-03-1992
			EP 0874055 A	28-10-1998
			ES 2128318 T	16-05-1999
			GR 3029461 T	28-05-1999
			JP 5505110 T	05-08-1993
			PT 97230 A,B	31-12-1991
			US 5866776 A	02-02-1999



...

091987204
Translation
5060

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH 99014 G1	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00714	International filing date (day/month/year) 22 March 2000 (22.03.00)	Priority date (day/month/year) 22 March 1999 (22.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/54, 15/82, A01H 5/00, A01N 63/02		
Applicant RHOBIO		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 October 2000 (05.10.00)	Date of completion of this report 05 June 2001 (05.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00714

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-40, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. 1-32, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/00/00714

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	6, 9-11, 16, 17, 19, 20, 22, 23	YES
	Claims	1-5, 7, 8, 12-15, 21, 24-32	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-32	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

- D1: Capellades M. et al.: 'The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissue' Plant Molecular Biology, NL, Nijhoff Publishers, Dordrecht, vol. 31, 1996, pages 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412
- D2: Lee, J. E. et al.: 'Genomic sequence and mapping of methyljasmonate-induced O-methyltransferase from barley (Hordeum vulgare L.)' Chemical Abstracts, vol. 128, no. 23, 8 June 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract no. 279382, XP002124705 -&
- D3: Lee, J. E. et al.: 'Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds' EMBL Accession No. U54767, 23 August 1996 (1996-08-23), XP002124698 & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363
- D4: Keller H. et al.: 'Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance' Plant Cell (1999), 11(2), 223-235, February 1999 (1999-02), XP002124696
- D5: WO 96/36697 A (Univ Pennsylvania) 21 November 1996

(1996-11-21)

The following document (D6) is not cited in the international search report. A copy of the document is attached.

D6: Kaufmann S. et al.: 'Two proteins secreted by *Phytophthora megasperma* elicit necrosis and defense-related responses in tobacco.', Chemical abstracts, vol. 120, no. 11, 14 March 1998, Columbus, Ohio, abstract no. 129730, XP-002124706

1. The present application fails to comply with the requirements of PCT Article 33(2) and (3) since the subject matter of claims 1-5, 7, 8, 12-15, 21 and 24-32 is neither novel nor inventive, for the following reasons:

1.1 The subject matter of claim 12 is not novel as a result of the lack of clarity of the expressions "selectively hybridisable" and "homologous sequences" (see also Box VIII, points 3 and 4). Therefore, the subject matter of claim 13 referring to the nucleic acid fragment according to claim 12 is not novel.

1.2 Document D1 describes a plasmid including a 1963 bp maize "caffeic acid O-methyltransferase (COMT)" gene promoter fragment. Said promoter can be induced and is responsive to injuries and elicitors, particularly elicitin [SPEC0803]-cryptogein. Therefore, the subject matter of claims 1-5 is clearly anticipated by D1.

Document D2 describes a genomic clone of which the sequence is described in document D3 and matches the

coding sequence of *Hordeum vulgare* L. (barley) gene COMT and the upstream sequence comprising 2690 bps upstream from the coding sequence. Said upstream sequences, including the promoter sequences, are jasmonate-inducible. This fragment includes a TATA box in the sequence thereof to enable the transcription and expression of the coding sequences located 104 bps upstream from the translation initiation site. Therefore, the subject matter of claims **1-5 and 7-8** is anticipated by document D2.

- 1.3 The plasmid described in document D1 includes, in addition to the maize COMT gene promoter fragment, the reporter gene coding for *E. coli* protein GUS inserted in such a way that it is transcribed and translated, and a non-transcribed 3' sequence (Nos terminator). Therefore, claims **14, 15 and 24** are neither novel nor inventive.
- Said vector described in D1 is used to transform tobacco. Stable transgenic tobacco plants are thus obtained. Therefore, the subject matter of claims **25-32** is neither novel nor inventive.
- 1.4 Document D4 describes a functional chimeric gene in tobacco plants including the promoter inducible by tobacco hsr203 pathogens, a sequence coding for elicitor cryptogein and terminator nos. Therefore, the subject matter of claim **21** is neither novel nor inventive.
2. The present application fails to comply with the requirements of PCT Article 33(3) because the subject matter of claims 9-11, 16-20, 22 and 23 is not inventive, for the following reasons:

- 2.1 The additional features described in claims **9-11** are merely commonplace variations in promoter structures that are well known to persons skilled in the art. A simple description of such features does not involve an inventive step.
- 2.2 Document D5 describes transgenic plants transformed with a vector including an elicitor-inducible promoter sequence, a sequence coding for a heterologous polypeptide and a terminator, whereby said heterologous polypeptide can be expressed and the transformed plants are thus rendered resistant to microbial phytopathogen-induced diseases. The heterologous polypeptide can be a bacterial or fungal elicitor. Consequently, including a heterologous sequence coding for an elicitor in the chimeric gene according to claims 14 and 15 is an obvious option for a person skilled in the art and does not involve an inventive step. It follows that the subject matter of claims **16 and 17** is not inventive.
- 2.3 Document D6 describes purified protein β -megaspermin and indicates the involvement thereof in the activation of genes involved in defending plants against aggressive agents. The use of this particular elicitor appears to be an obvious option for a person skilled in the art and does not involve an inventive step. Describing the nucleotide or amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 13 and 14, which corresponds to a purified protein available in the prior art, is part of the routine activities of a person skilled in the art and does not involve an inventive step. Therefore, the subject matter of

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/00/00714

claims **19, 20 and 22** is not inventive. The use of the promoters cited in claim **23** is part of the standard practice of a person skilled in the art and does not involve an inventive step.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The present application fails to comply with the requirements of PCT Article 6 since claims 1-32 are unclear, for the following reasons:

1. The term "nucleic acid fragment" is unclear because it could refer to a single nucleotide. Therefore, all of the claims that refer to said nucleic acid fragment are unclear.
2. The expression "3' end of the promoter" (claims 10 and 11) is unclear.
3. The expression "selectively hybridisable" (claim 12) is imprecise and should be replaced with a technical definition.
4. The term "homologous sequences" (claim 12) is imprecise and, in the absence of any criteria defining the degree of homology in the claims, could refer to any sequence.
5. The term "megaspermin" appears to be an in-house definition with no precise meaning for a person skilled in the art.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

REÇU D.P.I.

-- 7 JUIN 2001

Destinataire:

TETAZ Franck
AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.
DEPARTEMENT PROPRIETE INDUSTRIELLE
14-20 rue Pierre Baizet
BP 9163
69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 05.06.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
PH 99014 G1

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/00714

Date du dépôt international (jour/mois/année)
22/03/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
22/03/1999

Déposant
RHOBIO et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international

Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Neumann, M

Tél. +49 89 2399-7351



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00714

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-40 version initiale

Revendications, N°:

1-32 version initiale

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-13, déposées sous couvert d'une lettre du 07.06.00

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☒ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00714

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 6, 9-11, 16-17, 19-20, 22-23
	Non : Revendications 1-5, 7-8, 12-15, 21, 24-32
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-32
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-32
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: Capellades M. et al.: 'The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissue' Plant Molecular Biology, NL, Nijhoff Publishers, Dordrecht, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412
- D2: Lee, J. E. et al.: 'Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (Hordeum vulgare L.)' Chemical Abstracts, vol. 128, no. 23, 8 juin 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract n°. 279382, XP002124705 -&
- D3: Lee, J.E. et al.: 'Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds' EMBL Accession No:U54767, 23 août 1996 (1996-08-23), XP002124698 & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363,
- D4: Keller H et al.: 'Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance' Plant Cell (1999), 11(2), 223-235, février 1999 (1999-02), XP002124696
- D5: WO 96 36697 A (Univ Pennsylvania) 21 novembre 1996 (1996-11-21)

Le document suivant D6 n'a pas été cité dans le rapport de recherche international. Une copie de ce document est jointe en annexe.

- D6: Kaufmann S. et al.: 'Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco.', Chemical Abstracts, vol. 120, n°11, 14 mars 1998, Columbus, Ohio, abstract n°129730, XP-002124706

SECTION V

1. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(2) et (3) PCT, car l'objet des revendications 1-5, 7-8, 12-15, 21, 24-32 n'est pas nouveau ni inventif pour les raisons suivantes:
 - 1.1 En raison du manque de clarté des expressions "capable de s'hybrider de façon sélective" et "séquence homologues" (voir aussi section VIII points 3 et 4), l'objet de la revendication 12 n'est pas nouveau. Par conséquent, l'objet de la

revendication 13 se référant au fragment d'acide nucléique selon la revendication 12 n'est pas nouveau.

- 1.2 Le document D1 décrit un plasmide comprenant un fragment de 1963 pb du promoteur du gène "caffeic acid O-methyltransferase (COMT)" du maïs. Ledit promoteur est inductible, et répond aux blessures et aux éliciteurs, comme par exemple à l'élicitrine [SPEC0803]-cryptogéin. L'objet des revendications **1-5** est donc clairement anticipé par D1.

Le document D2 décrit un clone génomique dont la séquence est décrite dans le document D3, correspondant à la séquence codante du gène COMT de *Hordeum vulgare* L. (orge) et à la séquence amont, comprenant 2690 pb en amont de la séquence codante. Lesdites séquences amont, comprenant les séquences promotrices, sont inductibles par le jasmonate. Ce fragment comprend dans sa séquence promotrice une boîte Tata, dont le rôle est de permettre la transcription et l'expression des séquences codantes, située 104 pb en amont du site d'initiation de la traduction. L'objet des revendications **1-5, 7-8** est donc anticipé dans le document D2.

- 1.3 Le plasmide décrit dans le document D1 comprend, outre le fragment du promoteur du gène de la COMT du maïs, le gène rapporteur codant pour la protéine GUS d'*E. coli* inséré de façon à être transcrit et traduit, et une séquence 3' non transcrite (terminateur Nos). Les revendications **14-15, 24** ne sont donc ni nouvelles ni inventives.

Ledit vecteur décrit dans D1 est utilisé pour transformer le tabac. Des plants stables transgéniques de tabac sont ainsi obtenus. L'objet des revendications **25-32** n'est donc ni nouveau ni inventif.

- 1.4 Le document D4 décrit un gène chimère fonctionnel dans les plants de tabac comprenant le promoteur inductible par les pathogènes hsr203 de tabac, une séquence codant pour l'éliciteur cryptogéin et le terminateur nos. L'objet de la revendication **21** n'est donc ni nouveau ni inventif.

2. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(3) PCT, car l'objet des revendications 9-11, 16-20, 22-23 n'est pas inventif pour les raisons suivantes:

- 2.1 Les caractéristiques additionnelles décrites dans les revendications **9-11** représentent simplement des variations habituelles de la structure des promoteurs, bien connues de l'homme du métier. La simple description de ces caractéristiques n'implique pas d'activité inventive.
- 2.2 Le document D5 décrit des plantes transgéniques transformées avec un vecteur comprenant une séquence promotrice inductible par un éliciteur, une séquence codant pour un polypeptide hétérologue et un terminateur, de façon à permettre l'expression du dit polypeptide hétérologue, et conférant ainsi aux plantes transformées une résistance aux maladies dues aux phytopathogènes microbiens. Le polypeptide hétérologue peut être une élicitine d'origine fongique ou bactérienne. Par conséquent, l'inclusion d'une séquence hétérologue codant pour une élicitine dans le gène chimère selon les revendications 14-15 constitue pour l'homme du métier une possibilité évidente, n'impliquant pas d'activité inventive. Ainsi, l'objet des revendications **16-17** n'est pas inventif.
- 2.3 Le document D6 décrit la protéine purifiée β -mégaspermine et indique son rôle dans l'activation des gènes impliqués dans la défense des plantes contre les agents d'agression. L'utilisation de cette élicitine particulière apparaît être une possibilité évidente pour l'homme du métier et n'implique pas d'activité inventive. La description de la séquence de nucléotides ou d'acides aminés montrée dans les SEQ ID N° 13 et 14 correspondant à une protéine purifiée disponible dans l'art antérieur est une activité routinière pour l'homme de métier et n'implique pas d'activité inventive. Ainsi, l'objet des revendications **19-20, 22** n'est pas inventif. L'utilisation des promoteurs cités dans la revendication **23** entre dans la pratique courante pour l'homme du métier, et n'implique pas d'activité inventive.

SECTION VIII

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 6 PCT, car les revendications 1-32 ne sont pas claires pour les raisons suivantes:

1. Le terme "fragment d'acide nucléique" n'est pas clair car il peut comprendre un simple nucléotide. Par conséquent, l'ensemble des revendications, se référant au dit fragment d'acide nucléique, n'est pas clair.
2. L'expression "extrémité 3' du promoteur" (revendications 10-11) est vague.
3. L'expression "capables de s'hybrider de façon sélective" (revendication 12) est imprécise et devrait être remplacée par une définition technique.
4. L'expression "séquences homologues" (revendication 12) est imprécise et en l'absence de tout critère définissant le degré d'homologie dans les revendications, peut inclure toute séquence.
5. Le terme "mégaspermine" apparaît être une définition interne, sans signification précise pour l'homme de métier.



PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réserve à l'office

teur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) PH 99014 G1

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

Promoteur inductible COMTII, gène chimère le comprenant et plantes transformées

Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

RhoBio
14-20 rue Pierre Baizet
BP 9163
69263 LYON CEDEX 09

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone
04.72.85.25.92

n° de télécopieur
04.72.85.28.43

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'État) :
Française

Domicile (nom de l'État) :
Française

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☒ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

FRITIG Bernard
6 rue du Hohwald
67460 SOUFFELWEYERSHEIM

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :
FRANCE

Domicile (nom de l'État) :
FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme: ☐ mandataire ☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

Aventis CropScience S.A.
Département Propriété Industrielle
14 - 20 rue Pierre Baizet
BP 9163
69263 Lyon Cedex 09

n° de téléphone
04.72.85.25.92

n° de télécopieur
04.72.85.28.43

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.



Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)	
Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) TOQUIN Valérie 1, rue Henri Barbusse Saint Martin des Champs 29600 MORLAIX	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) GEOFFROY Pierrette 10, rue Fischart 67000 STRASBOURG	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) LEGRAND Michel 3, rue des Roses 67370 PFETTISHEIM	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) KAUFFMANN Serge 3, Cour du Moulin Zorn 67000 STRASBOURG	Cette personne est : <input type="checkbox"/> déposant seulement <input checked="" type="checkbox"/> déposant et inventeur <input type="checkbox"/> inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)
Nationalité (nom de l'Etat) : FRANCE	Domicile (nom de l'Etat) : FRANCE
Cette personne est déposant pour : <input type="checkbox"/> tous les États désignés <input type="checkbox"/> tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique <input checked="" type="checkbox"/> les États-Unis d'Amérique seulement <input type="checkbox"/> les États indiqués dans le cadre supplémentaire	
<input type="checkbox"/> D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.	

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

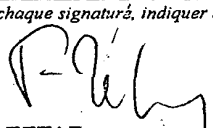
Brevet régional

- ☒ **AP** Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ République-Unie de Tanzanie, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ **EA** Brevet eurasiatique : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasiatique et du PCT
- ☒ **EP** Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ **OA** Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :

- | | |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanie | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Arménie | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Autriche | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input checked="" type="checkbox"/> MA Maroc |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input checked="" type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbade | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarie | <input checked="" type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Bélarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Allemagne | <input checked="" type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Danemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominique | <input checked="" type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonie | <input checked="" type="checkbox"/> SE Suède |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Espagne | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finlande | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenade | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Géorgie | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambie | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatie | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hongrie | <input checked="" type="checkbox"/> TZ République-Unie de Tanzanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonésie | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israël | <input checked="" type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Inde | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Islande | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR République de Corée | Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | au PCT après la publication de la présente feuille : |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algérie |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> |

Déclaration concernant les désignations de précaution: outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (La confirmation (y compris les taxes) doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITÉ		<input type="checkbox"/> D'autres indications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 22.03.99	99 03700	FRANCE		
(2) 11.06.99	99 07646	FRANCE		
(3)				
<input type="checkbox"/> L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : _____ * Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii)). Voir le cadre supplémentaire.				
Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE				
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA /		Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional) 3/12/99 FA 571739 FRANCE		
Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT				
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant : requête : 4 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 40 revendications : 4 abrégé : 1 dessins : 5 partie de la description réservée au listage des séquences : 15 Nombre total de feuilles : 69		Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input checked="" type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input checked="" type="checkbox"/> pouvoir distinct signé (5) 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : (2) 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input checked="" type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : copie du RR de la dde 99 03700		
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :		Langue de dépôt de la demande internationale :		
Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE				
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.				
 Franck TETAZ Groupement de mandataires n° 153 Aventis CropScience S.A.				

Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international	
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :	



1000

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only	
International Application No.	
International Filing Date	
Name of receiving Office and "PCT International Application"	
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) PH 99014 G1	

Box No. I	TITLE OF INVENTION
Inducible COMTII promoter, chimera gene containing same and transformed plants	

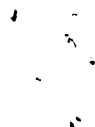
Box No. II		APPLICANT	
Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) RhoBio 14-20 rue Pierre Baizet BP 9163 69263 LYON CEDEX 09		<input type="checkbox"/> This person is also inventor.	Telephone No. 04.72.85.25.92 Facsimile No. 04.72.85.28.43 Teleprinter No.
State (that is, country) of nationality: French		State (that is, country) of residence: French	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			

Box No. III		FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) FRITIG Bernard 6 rue du Hohwald 67460 SOUFFELWEYERSHEIM		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: FRANCE		State (that is, country) of residence: FRANCE	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.			

Box No. IV		AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:		<input type="checkbox"/> agent	<input type="checkbox"/> common representative
Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Aventis CropScience S.A. Département Propriété Industrielle 14 - 20 rue Pierre Baizet BP 9163 69263 Lyon Cedex 09		Telephone No. 04.72.85.25.92 Facsimile No. 04.72.85.28.43 Teleprinter No.	
<input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.			



Continuation of Box No. III		FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>			
Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) TOQUIN Valérie 1, rue Henri Barbusse Saint Martin des Champs 29600 MORLAIX		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: FRANCE		State (that is, country) of residence: FRANCE	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) GEOFFROY Pierrette 10, rue Fischart 67000 STRASBOURG		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: FRANCE		State (that is, country) of residence: FRANCE	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) LEGRAND Michel 3, rue des Roses 67370 PFETTISHEIM		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (That is country) of nationality: FRANCE		State (that is, country) of residence: FRANCE	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
Name and address: (Family name followed by given name: for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) KAUFFMANN Serge 3, Cour du Moulin Zorn 67000 STRASBOURG		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: FRANCE		State (that is, country) of residence: FRANCE	
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box			
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.			



Box No. V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line).....

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina..... | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica..... | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic..... | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia..... | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain..... | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland..... | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Granada | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel..... | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India..... | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan..... | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya..... | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan..... | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea..... | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea..... | Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

B x No. VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 22.03.99	99/03,700	FRANCE		
item (2) 11.06.99	99/07,646	FRANCE		
item (3)				
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):				
* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box				
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				
Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen: the two-letter code may be used):		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)		
ISA /		3/12/99 FA 571739 FRANCE		
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING				
This international application contains the following number of sheets:		This international application is accompanied by the item(s) marked below:		
request :	4	1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet		
description (excluding sequence listing part) :	40	2. <input checked="" type="checkbox"/> separate signed power of attorney (5)		
claims :	4	3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any:		
abstract :	1	4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature		
drawings :	5	5. <input checked="" type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): (2)		
sequence listing part of description :	15	6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language):		
		7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material		
		8. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		
Total number of sheets:	69	9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): copy of SR of appln 99/03,700		
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application:		
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT				
Next to each signature indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).				
(signature) Franck TETAZ Group of representatives no.153 Aventis CropScience S.A.				

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/	
6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:



PATENT COOPERATION TREATY

PCTINFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.
Département Propriété Industrielle
14-20, rue Pierre Baizet
Boîte postale 9163
F-69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

[stamp]

Date of mailing (day/month/year)
01 November 2000 (01.11.00)

Applicant's or agent's file reference
PH 99014 G1

IMPORTANT INFORMATION

International application No.
PCT/FR00/00714

International filing date (day/month/year)
22 March 2000 (22.03.00)

Priority date (day/month/year)
22 March 1999 (22.03.99)

Applicant

RHOBIO etc

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP: GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EP: AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National: AG,AU,BG,CA,CN,CZ,DE,DZ,IL,JP,KP,KR,MN,NO,NZ,PL,RO,RU,SE,SK,US,

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA: AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
OA: BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National: AE,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BR,BY,CH,CR,CU,DK,DM,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,
LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MW,MX,PT,SD,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent including, where applicable, ES which cannot be elected since it is not bound by Chapter II.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Maria Kirchner

Telephone No. (41-22) 338.83.38

3624993

PATENT COOPERATION TREATY

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.
Département Propriété Industrielle
14-20, rue Pierre Baizet
Boîte postale 9163
F-69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

Date of mailing (day/month/year) 04 May 2000 (04.05.00)	
Applicant's or agent's file reference PH 99014 G1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/FR00/00714	International filing date (day/month/year) 22 March 2000 (22.03.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 22 March 1999 (22.03.99)
Applicant RHOBIO etc	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
22 March 1999 (22.03.99)	99/03,700	FR	14 Apr 2000 (14.04.00)
11 June 1999 (11.06.99)	99/07,646	FR	14 Apr 2000 (14.04.00)

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Simin Baharlou</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

003263387

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

[stamp]

To:

TETAZ Franck
AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.
DEPARTEMENT PROPRIETE INDUSTRIELLE
14-20 rue Pierre Baizet
BP 9163
69263 Lyon Cedex 09
FRANCE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)
05.06.2001

Applicant's or agent's file reference
PH 99014 G1

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/FR00/00714

International filing date (day/month/year)
22/03/2000

Priority date (day/month/year)
22/03/1999

Applicant

RHOBIO et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. + 49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: + 49 89 2399 - 4465

Authorized officer:

Neumann, M
Tel. +49 89 2399-7351



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference PH 99014 G1	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) </div>	
International application No. PCT/FR00/00714	International filing date (<i>day/month/year</i>) 22/03/2000	Priority date (<i>day/month/year</i>) 22/03/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/54		
Applicant RHOBIO et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of 7 sheets including this title page. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT). These annexes consist of a total of sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05/10/2000	Date of completion of this report 05.06.2001
Name and mailing address of the IPEA/ <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div>	Authorized officer: Loubradou-Bourges, N Telephone No. +49 89 2399 7342 <div style="text-align: right;"> </div>

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/00714

I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

1-40 as originally filed

Claims, No.:

1-32 as originally filed

Drawings, sheets:

1/5-5/5 as originally filed

The sequence listing part of the description:

1-13 filed with a letter dated 07.06.00

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/00714

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/fig

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty	Yes:	Claims	6, 9-11, 16-17, 19-20, 22-23
	No:	Claims	1-5, 7-8, 12-15, 21, 24-32
Inventive Step	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-32
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-32
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VIII. Certain observations in the international application

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Reference is made to the following documents:

- D1: Capellades M. et al.: 'The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissue' Plant Molecular Biology, NL Nijhoff Publishers, Dordrecht, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412
- D2: Lee, J.E. et al.: 'Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O-methyltransferase from barley (*Hordeum vulgare* L.)' Chemical Abstracts, vol. 128, No. 23, June 8, 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract No. 279382, XP002124705-&
- D3: Lee, J.E. et al.: 'Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds' EMBL Accession No:U54767, August 23, 1996 (1996-08-23), XP00212698 & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363,
- D4: Keller H et al.: 'Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance' Plant Cell (1999), 11(2), 223-235, February 1999 (1999-02), XP002124696
- D5: WO 96 36697 A (Univ Pennsylvania) November 21, 1996 (1996-11-21)

The following document D6 was not cited in the international search report. A copy of that document is attached in the annex.

- D6: Kaufmann S. et al.: 'Two proteins secreted by *Phytophthora megasperma* elicit necrosis and defense-related responses in tobacco.', Chemical Abstracts, vol. 120, No. 11, March 14, 1998, Columbus, Ohio, abstract No. 129730, XP-002124706

SECTION V

- 1. The present application does not satisfy the conditions stated in article 33(2) and (3) PCT, since the subject matter of claims 1-5, 7-8, 12-15, 21 and 24-32 is neither novel nor inventive for the following reasons:
 - 1.1 Because of the lack of clarity of the expressions "capable of hybridizing selectively" and "homologous sequences" (see also section VIII, points 3 and 4), the subject matter of claim 12 is not novel. Consequently, the subject matter of claim 13, which refers to the nucleic acid fragment as claimed in claim 12, is not novel.
 - 1.2 Document D1 describes a plasmid comprising a 1963 bp fragment of the promoter of the maize "caffeic acid O-methyltransferase (COMT)" gene. Said



promoter is inducible and responds to injuries and to elicitors, such as for example to the elicitor [SPEC0803]-cryptogein. The subject matter of claims **1-5** is therefore clearly anticipated by D1.

Document D2 describes a genomic clone, the sequence of which is described in document D3, corresponding to the coding sequence of the *Hordeum vulgare* L. (barley) COMT gene and to the sequence upstream, comprising 2690 bp upstream of the coding sequence. Said upstream sequences, comprising the promoter sequences, are inducible with jasmonate. This fragment comprises, in its promoter sequence, a Tata box, the role of which is to allow the transcription and expression of the coding sequences, located 104 bp upstream of the translation initiation site. The subject matter of claims **1-5 and 7-8** is therefore anticipated in document D2.

- 1.3 The plasmid described in document D1 comprises, besides the fragment of the promoter of the maize COMT gene, the reporter gene encoding the *E. coli* GUS protein, inserted so as to be transcribed and translated, and a 3' nontranscribed sequence (Nos terminator). Claims **14-15 and 24** are therefore neither novel nor inventive.

Said vector described in D1 is used to transform tobacco. Stable transgenic tobacco plants are thus obtained. The subject matter of claims **25-32** is therefore neither novel nor inventive.

- 1.4 Document D4 describes a chimeric gene which is functional in tobacco plants comprising the promoter inducible by hsr203 tobacco pathogens, a sequence encoding the elicitor cryptogein and the nos terminator. The subject matter of claim **21** is therefore neither novel nor inventive.

2. The present application does not satisfy the conditions stated in article 33(3) PCT since the subject matter of claims 9-11, 16-20, and 22-23 is not inventive for the following reasons:

- 2.1 The additional characteristics described in claims **9-11** merely represent conventional variations of the structure of promoters, which are well known to those skilled in the art. Merely describing these characteristics does not involve an inventive step.

- 2.2 Document D5 describes transgenic plants transformed with a vector which comprises a promoter inducible by an elicitor, a sequence encoding a

heterologous polypeptide and a terminator, so as to allow the expression of said heterologous polypeptide, and which thus confers on the transformed plants resistance to diseases caused by microbial phytopathogens. The heterologous polypeptide may be an elicitor of fungal or bacterial origin. Consequently, the inclusion of a heterologous sequence encoding an elicitor in the chimeric gene as claimed in claims 14-15 constitutes, for those skilled in the art, an obvious possibility which does not involve an inventive step. Thus the subject matter of claims **16-17** is not inventive.

- 2.3 Document D6 describes the purified β -megaspermine protein and indicates its role in the activation of genes involved in the defence of plants against agents responsible for attack. The use of this particular elicitor appears to be a possibility which is obvious to those skilled in the art and does not involve an inventive step. The description of the nucleotide or amino acid sequence shown in SEQ ID Nos. 13 and 14 corresponding to a purified protein available in the prior art is a routine activity for those skilled in the art and does not involve an inventive step. Thus, the subject matter of claims **19-20 and 22** is not inventive. The use of the promoters cited in claim **23** is a matter of common practice for those skilled in the art and does not involve an inventive step.

SECTION VIII

The present application does not satisfy the conditions stated in article 6 PCT since claims 1-32 are not clear for the following reasons:

1. The term "nucleic acid fragment" is not clear since it may comprise a single nucleotide. Consequently, said claims referring to said nucleic acid fragment is not clear.
2. The expression "3' end of the promoter" (claims 10-11) is vague.
3. The expression "capable of hybridizing selectively" (claim 12) is imprecise and should be replaced with a technical definition.
4. The expression "homologous sequences" (claim 12) is imprecise and, in the absence of any criterion defining the degree of homology in the claims, may include any sequence.

5. The term "megaspermine" appears to be an internal definition which has no precise meaning for those skilled in the art.

4

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS


PCT

REC'D 08 JUN 2001

WIFO PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PH 99014 G1	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00714	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/03/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/03/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/54		
Déposant RHOBIO et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 05/10/2000	Date d'achèvement du présent rapport 05.06.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Loubradou-Bourges, N N° de téléphone +49 89 2399 7342	



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00714

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-40 version initiale

Revendications, N°:

1-32 version initiale

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-13, déposées sous couvert d'une lettre du 07.06.00

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☒ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00714

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 6, 9-11, 16-17, 19-20, 22-23
	Non : Revendications 1-5, 7-8, 12-15, 21, 24-32
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-32
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-32
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: Capellades M. et al.: 'The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissue' Plant Molecular Biology, NL, Nijhoff Publishers, Dordrecht, vol. 31, 1996, page 307-322 XP002054327 ISSN: 0167-4412
- D2: Lee, J. E. et al.: 'Genomic sequence and mapping of a methyljasmonate-induced O- methyltransferase from barley (Hordeum vulgare L.)' Chemical Abstracts, vol. 128, no. 23, 8 juin 1998 (1998-06-08) Columbus, Ohio, US; abstract n°. 279382, XP002124705 -&
- D3: Lee, J.E. et al.: 'Hordeum vulgare caffeic acid O-methyltransferase (HvCOMT) gene, complete cds' EMBL Accession No:U54767, 23 août 1996 (1996-08-23), XP002124698 & DNA SEQUENCE, vol. 7, no. 6, 1997, pages 357-363,
- D4: Keller H et al.: 'Pathogen- induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance' Plant Cell (1999), 11(2), 223-235, février 1999 (1999-02), XP002124696
- D5: WO 96 36697 A (Univ Pennsylvania) 21 novembre 1996 (1996-11-21)

Le document suivant D6 n'a pas été cité dans le rapport de recherche international. Une copie de ce document est jointe en annexe.

- D6: Kaufmann S. et al.: 'Two proteins secreted by Phytophthora megasperma elicit necrosis and defense-related responses in tobacco.', Chemical Abstracts, vol. 120, n°11, 14 mars 1998, Columbus, Ohio, abstract n°129730, XP-002124706

SECTION V

- 1. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(2) et (3) PCT, car l'objet des revendications 1-5, 7-8, 12-15, 21, 24-32 n'est pas nouveau ni inventif pour les raisons suivantes:
 - 1.1 En raison du manque de clarté des expressions "capable de s'hybrider de façon sélective" et "séquence homologues" (voir aussi section VIII points 3 et 4), l'objet de la revendication 12 n'est pas nouveau. Par conséquent, l'objet de la

revendication 13 se référant au fragment d'acide nucléique selon la revendication 12 n'est pas nouveau.

- 1.2 Le document D1 décrit un plasmide comprenant un fragment de 1963 pb du promoteur du gène "caffeic acid O-methyltransferase (COMT)" du maïs. Ledit promoteur est inductible, et répond aux blessures et aux éliciteurs, comme par exemple à l'élicitrine [SPEC0803]-cryptogéin. L'objet des revendications **1-5** est donc clairement anticipé par D1.

Le document D2 décrit un clone génomique dont la séquence est décrite dans le document D3, correspondant à la séquence codante du gène COMT de *Hordeum vulgare* L. (orge) et à la séquence amont, comprenant 2690 pb en amont de la séquence codante. Lesdites séquences amont, comprenant les séquences promotrices, sont inductibles par le jasmonate. Ce fragment comprend dans sa séquence promotrice une boîte Tata, dont le rôle est de permettre la transcription et l'expression des séquences codantes, située 104 pb en amont du site d'initiation de la traduction. L'objet des revendications **1-5, 7-8** est donc anticipé dans le document D2.

- 1.3 Le plasmide décrit dans le document D1 comprend, outre le fragment du promoteur du gène de la COMT du maïs, le gène rapporteur codant pour la protéine GUS d'*E. coli* inséré de façon à être transcrit et traduit, et une séquence 3' non transcrite (terminateur Nos). Les revendications **14-15, 24** ne sont donc ni nouvelles ni inventives.

Ledit vecteur décrit dans D1 est utilisé pour transformer le tabac. Des plants stables transgéniques de tabac sont ainsi obtenus. L'objet des revendications **25-32** n'est donc ni nouveau ni inventif.

- 1.4 Le document D4 décrit un gène chimère fonctionnel dans les plants de tabac comprenant le promoteur inductible par les pathogènes hsr203 de tabac, une séquence codant pour l'éliciteur cryptogéin et le terminateur nos. L'objet de la revendication **21** n'est donc ni nouveau ni inventif.

2. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(3) PCT, car l'objet des revendications 9-11, 16-20, 22-23 n'est pas inventif pour les raisons suivantes:

- 2.1 Les caractéristiques additionnelles décrites dans les revendications **9-11** représentent simplement des variations habituelles de la structure des promoteurs, bien connues de l'homme du métier. La simple description de ces caractéristiques n'implique pas d'activité inventive.
- 2.2 Le document D5 décrit des plantes transgéniques transformées avec un vecteur comprenant une séquence promotrice inductible par un éliciteur, une séquence codant pour un polypeptide hétérologue et un terminateur, de façon à permettre l'expression du dit polypeptide hétérologue, et conférant ainsi aux plantes transformées une résistance aux maladies dues aux phytopathogènes microbiens. Le polypeptide hétérologue peut être une élicitine d'origine fongique ou bactérienne. Par conséquent, l'inclusion d'une séquence hétérologue codant pour une élicitine dans le gène chimère selon les revendications 14-15 constitue pour l'homme du métier une possibilité évidente, n'impliquant pas d'activité inventive. Ainsi, l'objet des revendications **16-17** n'est pas inventif.
- 2.3 Le document D6 décrit la protéine purifiée β -mégaspermine et indique son rôle dans l'activation des gènes impliqués dans la défense des plantes contre les agents d'agression. L'utilisation de cette élicitine particulière apparaît être une possibilité évidente pour l'homme du métier et n'implique pas d'activité inventive. La description de la séquence de nucléotides ou d'acides aminés montrée dans les SEQ ID N° 13 et 14 correspondant à une protéine purifiée disponible dans l'art antérieur est une activité routinière pour l'homme de métier et n'implique pas d'activité inventive. Ainsi, l'objet des revendications **19-20, 22** n'est pas inventif. L'utilisation des promoteurs cités dans la revendication **23** entre dans la pratique courante pour l'homme du métier, et n'implique pas d'activité inventive.

SECTION VIII

La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 6 PCT, car les revendications 1-32 ne sont pas claires pour les raisons suivantes:

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Demande internationale n° PCT/FR00/00714

1. Le terme "fragment d'acide nucléique" n'est pas clair car il peut comprendre un simple nucléotide. Par conséquent, l'ensemble des revendications, se référant au dit fragment d'acide nucléique, n'est pas clair.
2. L'expression "extrémité 3' du promoteur" (revendications 10-11) est vague.
3. L'expression "capables de s'hybrider de façon sélective" (revendication 12) est imprécise et devrait être remplacée par une définition technique.
4. L'expression "séquences homologues" (revendication 12) est imprécise et en l'absence de tout critère définissant le degré d'homologie dans les revendications, peut inclure toute séquence.
5. Le terme "mégaspermine" apparaît être une définition interne, sans signification précise pour l'homme de métier.

